



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia**

**Dissertação de Mestrado**

**Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**

**Luciane Dias da Silva**

**2014**

**Luciane Dias da Silva**

**Dissertação de Mestrado**

**Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**

**Linha de Pesquisa**

**Síntese e caracterização de complexos nanoestruturados**

**Orientador: Luciano Paulino da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**Brasília, DF**

**2014**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me dar força interior e mostrar sempre o melhor caminho. Agradeço aos meus pais, irmãs e cunhados pelo carinho, compreensão e incentivo sempre presente. Agradeço ao meu marido Eduardo pelo companheirismo e apoio inestimável. E agradeço ao meu filho por tornar minha vida ainda mais intensa.

Agradeço a todos os professores que tive nessa jornada, os quais colaboraram para o meu amadurecimento científico, profissional e pessoal. Agradeço especialmente ao meu orientador Luciano Paulino a quem estimo e agradeço pela dedicação, amizade e paciência inabalável.

Agradeço a todos os amigos e colegas pelo apoio e experiências compartilhadas nesse período. Ressaltando que entre esses há aqueles que, além disso, me ajudaram em alguns dos experimentos realizados nesse trabalho (Marcelo Ramada, Cíntia Bonatto, Ivy Garcez, Clara Freitas, Vanessa Albernaz, Carla Soll, Bruna Agustini e Cláudio Lopes).

Agradeço aos responsáveis pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da EMBRAPA/CENARGEN (Dr. Carlos Bloch Jr. e Dr. Luciano Paulino da Silva), principalmente pela sala de Nanobiotecnologia, onde realizei grande parte do meu trabalho teórico e experimental com técnicas como: síntese de nanopartículas, espectrofotometria, espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta de superfície e microscopia de força atômica (MFA).

Agradeço aos responsáveis pelo Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos da EMBRAPA/CENARGEN, Dr. Thales Rocha e Dra. Vera Polez, pela ajuda com os experimentos com nematoides e bactérias, pelo apoio e pela amizade.

Ao responsável pelo Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás, Dr. Cirano José Ulhoa, pelos ensaios com fungos filamentosos.

Agradeço a responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília, Dra. Sônia Nair Bão, pelas análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

À responsável pelo Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília, Dra. Sônia de Freitas, por análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Ao responsável pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília, Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pelos ensaios de atividade com fibroblastos.

À responsável pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da EMBRAPA/CENARGEN, Dra. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes, pelos ensaios com larvas de inseto e por disponibilizar infraestrutura para os ensaios com leveduras, as quais foram disponibilizadas pela EMBRAPA/UVA E VINHO à qual também agradeço.

Agradeço a todos que de alguma forma (direta ou indiretamente) contribuíram para execução desse trabalho.

O começo de todas as ciências é o espanto  
de as coisas serem o que são.

(Aristóteles)

## Resumo

A síntese de nanopartículas metálicas (NPMs) por sistemas biológicos é conhecida como síntese verde ou biossíntese e pode ser realizada utilizando organismos procarióticos e eucarióticos ou partes deles. Nessa estratégia de síntese, ao invés do uso de agentes tóxicos para a redução do íon metálico, a obtenção das NPMs é mediada por componentes biológicos capazes de reduzir o metal. Nesse contexto, o presente trabalho utiliza extratos aquosos produzidos a partir do fruto (casca, polpa e semente) e folhas da planta *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) para obter nanopartículas de prata (AgNPs). Essas NPMs possuem, entre outras, propriedade antimicrobiana. Por isso, testes de atividade biológica são abordados após a obtenção das AgNPs. A caracterização das AgNPs foi realizada por meio de espectrofotometria, espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta de superfície, condutividade elétrica e microscopia de força atômica (MFA). Apesar da síntese verde ainda não ter seus mecanismos claramente elucidados, sabe-se que a biorredução da  $Ag^+$  e a estabilização da  $Ag^0$  são realizadas por uma combinação de metabólitos primários e secundários presentes no extrato. Considerando que a variação desses metabólitos influenciam a formação de AgNPs, diferentes tipos de extratos aquosos foram utilizados. Extratos de frutos maduros coletados no verão (período de chuvas) e no inverno (período de seca) e de frutos verdes coletados no inverno foram utilizados. Extratos das folhas coletadas no verão também foram utilizados. As diferenças de sazonalidade e partes da planta, das concentrações dos extratos e da temperatura foram abordadas por serem potencialmente alguns dos fatores que influenciam a síntese das AgNPs. Após formadas, as AgNPs apresentaram absorvância máxima em torno de 420 nm. Observou-se também grande variação dos diâmetros hidrodinâmicos e dos índices de polidispersividade (PdI) das AgNPs obtidas. A condutividade elétrica teve influência direta da concentração dos extratos. Na síntese a  $75^\circ C$ , utilizando o extrato das folhas, obteve-se AgNPs com valores expressivamente baixos de PdI ( $\sim 0,274 \pm 0,001$ ) e diâmetro hidrodinâmico de  $81,77 \pm 0,25$  nm. Convém ressaltar que tais valores de PdI são sempre almejados, e dificilmente são alcançados inclusive por vias convencionais de síntese química. A carga superficial dessas AgNPs chegou a cerca de  $-27,7 \pm 0,4$  mV, as quais conservaram sua estabilidade, a  $4^\circ C$ , por aproximadamente 3 meses. Amostras de AgNPs obtidas dos extratos dos frutos e de folhas foram submetidas a testes biológicos. Apenas as AgNPs obtidas de extratos de folhas foram imobilizadas na superfície interna de preformas de poli (tereftalato de etileno) e de microtubos de polipropileno. Imagens topográficas de MFA indicaram diferenças significativas entre as superfícies de preformas na presença e na ausência das partículas. No teste de atividade utilizando larvas de *Aedes aegypti* de quarto estágio, as larvas sobreviventes tiveram alteração motora nos tratamentos com maior concentração de AgNPs livres oriundas do extrato de folhas, assim como nas AgNPs imobilizadas em preformas, sendo que quase 50% da população de larvas apresentou movimentos lentos. AgNPs do extrato das folhas não apresentaram atividade hemolítica, nem interferência na viabilidade da levedura *Candida krusei*. As AgNPs não tiveram efetividade satisfatória contra *Escherichia coli* quando comparadas ao controle positivo. Contudo, a viabilidade dos nematoides *Caenorhabditis elegans* teve redução equivalente ao controle positivo com AgNPs em maior concentração. AgNPs livres a  $1 \mu M$  mataram 100% dos nematoides *Meloidogone incognita*. Essas AgNPs, quando imobilizadas nos microtubos, surpreendente apresentaram o mesmo perfil de atividade. AgNPs provenientes de extratos do fruto inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Trichophyton mentagrophytes* e apresentaram maior toxicidade que a prata livre em fibroblastos da linhagem NIH 3T3. Nesse contexto, as rotas de síntese verde com extratos de frutos e folhas de *H. speciosa* realizadas no presente trabalho resultaram em AgNPs com características diferenciais. Tanto AgNPs livres quanto imobilizadas apresentaram potencial de atividade antimicrobiana e interferência na mobilidade de larvas de insetos e sobrevivência de nematoides.

**Palavras chaves:** síntese verde, nanopartículas de prata, *Hancornia speciosa* Gomes

## Abstract

Metal nanoparticles (MNPs) synthesis by biological systems is known as green synthesis or biosynthesis. It may be performed either by prokaryotic or eukaryotic organisms or by thereof parts. This MNPs synthetic route is mediated by biological components capable of reducing the metal instead of using toxic compounds for reducing the metal ion. In this context, this study used aqueous extracts from the fruit (peel, pulp and seed) and leaves of *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) for silver nanoparticles (AgNPs) synthesis. Among other properties, these MNPs present antimicrobial activity. Therefore, biological tests concerning AgNPs activity were performed. AgNPs characterization included spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), surface Zeta potential, electrical conductivity and atomic force microscopy (AFM). Although the green synthesis mechanisms are not yet clearly elucidated, it is known that  $\text{Ag}^+$  bioreduction and  $\text{Ag}^0$  stabilization are performed by plant extract primary and secondary metabolites combination. Since these metabolites variation influence AgNPs formation, it was selected different types of aqueous extracts on the present study. Ripe fruit collected in summer (rainy season) and winter (dry season) and unripe fruits collected in winter were used to obtain the extracts. There were also used extracts from leaves collected in the summer. Differences in seasonality and plant parts, such as concentrations and temperature were tested in the AgNPs synthesis. AgNPs showed maximum absorbance around 420 nm. There was a wide variation in hydrodynamic diameter and polydispersity index (PdI) of the AgNPs. Electrical conductivity had a direct influence of extracts concentration. The synthesis at 75°C and using leaves extract resulted in PdI significantly lower values ( $\sim 0.274 \pm 0.001$ ), and  $81.77 \pm 0.25$  nm of AgNPs hydrodynamic diameter. This PdI values and hydrodynamic diameter are always largely desired and are hardly achieved, even by conventional chemical synthesis routes. AgNPs surface charge were around  $-27.7 \pm 0.4$  mV, which retained their stability (at 4°C) for about 3 months. AgNPs obtained from fruit and leaves extracts were subjected to biological tests. Only AgNPs from leaf extracts were immobilized on the inner surface of poly (ethylene terephthalate) preforms and polypropylene microtubes. AFM topographical images indicated significant differences between the preforms surfaces considering the particles presence and absence. Testing AgNPs against *Aedes aegypti* fourth stage larvae survival resulted in motion changes on the treatments with high concentration of free AgNPs from leaves extract, as well as in AgNPs immobilized in preforms, with almost 50% of the larvae population showing exhibited slow movements. AgNPs leaves extract showed no hemolytic activity, or interference on the *Candida krusei* yeast viability. AgNPs had low effectiveness against *Escherichia coli* compared to the positive control. However, nematode *Caenorhabditis elegans* viability was equivalent to the positive control with AgNPs in higher concentration. Free AgNPs killed 100% of *Meloidogene incognita* nematodes. When these AgNPs were immobilized on the microtubes, it surprising showed the same activity profile. AgNPs from fruit extracts inhibited the fungus *Fusarium oxysporum* and *Trichophyton mentagrophytes* growth and demonstrated showed higher toxicity than the free silver in the NIH 3T3 fibroblasts. In this context, green synthesis routes with *H. speciosa* fruit and leaves extracts resulted in AgNPs with differential characteristics. Either free or immobilized AgNPs showed potential for antimicrobial activity and interference in insect larvae mobility and nematode survival.

**Keywords:** green synthesis, silver nanoparticles, *Hancornia speciosa* Gomes

## Lista de ilustrações

- Figura 1:** Esquema ilustrativo do princípio da síntese verde de NPMs utilizando plantas: íons prata são reduzidos e há a nucleação, crescimento e estabilização das nanopartículas formadas por metabólitos primários e/ou secundários da planta.....23
- Figura 2:** Planta adulta de mangabeira. Foto: Josué Francisco da Silva Junior. ....25
- Figura 3:** Síntese de AgNPs por extratos aquosos do fruto maduro de *H. speciosa* monitorada por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 2,5 horas. A biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e sementes do fruto de mangaba coletados no verão referem-se às letras A, B e C, respectivamente. ....41
- Figura 4:** Determinação do diâmetro hidrodinâmico (número - %) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas por extratos de *H. speciosa* coletados na estação verão. Onde: A refere-se às AgNPs provenientes da síntese com extrato da casca do fruto, B às AgNPs da síntese com extrato da polpa do fruto e C às AgNPs da síntese com extrato das sementes. ....44
- Figura 5:** Microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas por extratos aquosos da casca, polpa e semente de mangaba. As imagens topográficas (altura) apresentadas foram adquiridas em modo dinâmico, com resolução de  $512 \times 512$  linhas e frequência de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma das imagens adquiridas totalizadas em aproximadamente 400 AgNPs medidas, das quais o valor da altura, é representado pelos histogramas à direita. A refere-se à amostra Casca\_AgNPs\_25; B à amostra Casca\_AgNPs\_6; C refere-se à amostra Polpa\_AgNPs\_12; D à amostra Semente\_AgNPs\_6; E refere-se à amostra Semente\_AgNPs\_3.....47
- Figura 6:** Síntese de AgNPs por extratos aquosos dos frutos maduros de *H. speciosa* coletados no inverno (período de seca) monitorada por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 2,5 horas. A

<p>biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e semente do fruto maduro de mangaba, coletados na estação inverno, referem-se às letras A, B e C, respectivamente. ....</p> <p><b>Figura 7:</b> Determinação do diâmetro hidrodinâmico por espalhamento de luz dinâmico (DLS), referente ao número (%) de AgNPs sintetizadas por extratos aquosos do fruto maduro de <i>H. speciosa</i> coletados na estação inverno. Onde: A refere-se às AgNPs provenientes da síntese por extrato da casca do fruto, B às AgNPs da síntese por extrato da polpa do fruto e C às AgNPs da síntese por extrato da semente. ....</p> <p><b>Figura 8:</b> Síntese de AgNPs por extratos aquosos do fruto verde de <i>H. speciosa</i> monitorada por espectroscopia de absorbância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 24 horas. A biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e semente dos frutos verdes colhidos no inverno referem-se às letras A, B e C, respectivamente. ....</p> <p><b>Figura 9:</b> Determinação do diâmetro hidrodinâmico (número - %) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas por extratos dos frutos verdes de <i>H. speciosa</i>. Onde: A refere-se às AgNPs da síntese por extrato das cascas, B às AgNPs da síntese por extrato das polpas e C às AgNPs da síntese por extrato das sementes dos frutos verdes colhidos no inverno. ....</p> <p><b>Figura 10:</b> Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de <i>H. speciosa</i> obtidas a 50°C por 24 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas (amostra diluídas a 1:5). ....</p> <p><b>Figura 11:</b> Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de <i>H. speciosa</i> em 5 concentrações a temperatura de 75°C por 24 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas (amostras diluídas a 1:5). ....</p>	<p>49</p> <p>51</p> <p>52</p> <p>54</p> <p>59</p> <p>60</p>
---	---

**Figura 12:** Monitoramento da síntese de AgNPs com extrato das folhas de *H. speciosa* a 6,25 mg/mL à temperatura de 75°C por 24 horas. Onde: A refere-se à técnica de espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm (amostra diluída 10×), B e C referem-se à técnica de DLS (Z-average e PDI) e D refere-se à técnica de potencial Zeta de superfície (amostra diluída 5×).

.....63

**Figura 13:** Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de *H. speciosa* a 6,25 mg/mL a 75°C por 12 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas da amostra (amostras diluídas a 1:5)..... 64

**Figura 14:** Imagem de microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extrato das folhas de *H. speciosa* na concentração de 6,25 mg/mL (Folha\_AgNPs\_6). As imagens topográficas (altura) apresentadas (A) foram adquiridas em modo dinâmico, com resolução de 512 × 512 linhas e frequência de 1 Hz. Cada imagem representativa em 2D refere-se a uma das diversas imagens adquiridas para totalizar um número de aproximadamente 400 AgNPs medidas, das quais o valor da altura, é representado pelo histograma à direita (B).....65

**Figura 15:** Teste de estabilidade coloidal de AgNPs\_6 obtidas por síntese verde com extrato das folhas de *H. speciosa* a 75°C por 12 horas. O monitoramento foi realizado durante 3 meses no qual foi avaliada o diâmetro hidrodinâmico (A), o PDI (B), o potencial Zeta (C) e a condutividade elétrica (D) das AgNPs. .... 67

**Figura 16:** Teste de dissolução de AgNPs\_6 obtidas por síntese verde com extrato da folha de *H. speciosa* a 75°C por 12 horas com ácido nítrico. O teste foi monitorado no período de 48 horas por meio de espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm. .... 69

**Figura 17:** Desenho esquemático de preforma PET com as 3 áreas de análises ..... 70

**Figura 18:** Imagens topográficas (3D - Mix) da superfície interna de preformas PET obtidas por microscopia de força atômica em modo contato. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> referem-se às amostras de

tubos incolores, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> referem-se às amostras de tubos verdes e C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> referem-se às amostras de tubos pretos das áreas 1, 2 e 3 respectivamente. .... 71

**Figura 19:** Nanorrugosidade da superfície interna de preformas PET obtida por meio de microscopia de força atômica em relação aos parâmetros Ra, Rq, Rz e Rzjis (A, B, C e D respectivamente). Os histogramas mostram que há diferença significativa entre as áreas do mesmo tipo de tubo. As representações a1, a2 e a3 indicam a existência de diferença significativa comparadas às áreas 1, 2 e 3 do mesmo tubo respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 72

**Figura 20:** Parâmetros de espectroscopia de força de superfície interna de preformas PET. A, B, C e D referem-se a *Snap in*, *Max load*, *Detach force* e módulo de Young (*Young modulus*), respectivamente. Esses parâmetros mostram que há diferença significativa entre amostras das áreas do mesmo tubo. Representação a1 e a2 indicaram diferenças significativas quando comparado as áreas 1 e 2 do mesmo tubo, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 73

**Figura 21:** Imagens topográficas (3D - Mix) da superfície interna de preformas PET obtidas por MFA em modo contato. A refere-se à area 3 do tubo incolor correspondente ao controle com AgNO<sub>3</sub> e B refere-se à area 3 do tubo incolor correspondente a superfície imobilizada com AgNPs. .... 75

**Figura 22:** Nanorrugosidade da superfície interna de preformas PET em relação aos parâmetros Ra, Rq, Rz e Rzjis após tratamento com AgNPs e AgNO<sub>3</sub>. O histograma mostra que não há diferença significativa entre a área referente ao controle com AgNO<sub>3</sub> e a área refernete às AgNPs\_6 imobilizadas ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 76

**Figura 23:** Espectroscopia de força de superfície interna de preformas PET após tratamento com AgNPs e AgNO<sub>3</sub>. A refere-se aos parâmetros *Snap in*, *Max load* e *Detach force* e B refere-se ao módulo de *Young (Young modulus)*. Onde: \* indica diferença estatística

significativa em relação ao controle e  $\alpha$  indica diferença estatística significativa com relação ao controle com prata livre ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média..... 77

**Figura 24:** Teste hemolítico em várias concentrações de AgNPs\_6 obtidas por síntese verde com folhas de *H. speciosa*. No controle positivo tem presença de água e o controle negativo, solução fisiológica a 0,9%. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 82

**Figura 25:** Percentual de viabilidade celular de *C. krusei* por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs\_6 obtida por síntese com extrato de folhas de *H. speciosa*. Onde: \* indica diferença estatística significativa em relação ao controle negativo e  $\alpha$  indica diferença estatística significativa com relação ao controle com prata livre de mesma concentração equivalente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 83

**Figura 26:** Percentual de indivíduos vivos de *C. elegans* por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs\_6 obtidas por síntese com extrato de folhas de *H. speciosa*. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo,  $\alpha$  indica diferença em relação ao controle com a prata livre de mesma concentração e  $\beta$  indica diferença em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média..... 84

**Figura 27:** Percentual de indivíduos de *M. incognita* vivos após 48 horas na presença de amostras de Folha\_AgNPs\_6 (obtidas por síntese com extrato das folhas de *H. speciosa*) livres (A) e imobilizadas (B) em microtubos de polipropileno. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo,  $\alpha$  indica diferença em relação ao controle com prata livre de mesma concentração e  $\beta$  indica diferença em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 86

**Figura 28:** Imagens de microscopia de luz de fitonematoides *M. incognita* após tratamento durante 48 horas com AgNPs\_6 livres. A refere-se à amostra com AgNPs, B refere-se ao

controle com AgNO<sub>3</sub> e C refere-se ao controle com extrato. Onde: 1, 2 e 3 correspondem às concentrações 100 µM, 1 µM e 0,1 µM. As barras nas imagens representam 50 µm. ....87

**Figura 29:** Imagens obtidas por microscopia de luz de fitonematoides *M. incognita* após tratamento durante 48 horas com AgNPs\_6 imobilizadas em microtubos de polipropileno. A refere-se aos microtubos com AgNPs, B refere-se aos microtubos com AgNO<sub>3</sub>, C refere-se aos microtubos com extrato e D refere-se ao controle negativo (água). As barras nas imagens representam 50 µm. ....88

**Figura 30:** Percentual de larvas de mosquito *A. aegypti* na presença de amostras de Folha\_AgNPs\_6 (obtidas por síntese com extratos aquosos das folhas de *H. speciosa*) livres e imobilizadas em preformas PET. Os gráficos com a percentagem de organismos vivos (A), de alteração dos movimentos dos nematoides sobreviventes (B) e de presença de pupa (C) estão relacionados com as amostras testadas e seus respectivos controles. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo, α indica diferença em relação ao controle com a prata livre de mesma concentração (p < 0,05). Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média.....89

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Concentrações de extratos da casca, polpa ou semente e folhas de <i>H. speciosa</i> nas amostras de nanopartículas de prata e em seus respectivos controles (contendo somente os extratos).....	30
<b>Tabela 2:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta de superfície e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos de <i>H. speciosa</i> em cinco concentrações do extrato da casca, polpa e semente dos frutos maduro colhidos no verão. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	43
<b>Tabela 3:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos da casca, polpa e semente do fruto maduro de <i>H. speciosa</i> colhidos no inverno. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média. ....	50
<b>Tabela 4:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos da casca, polpa e semente dos frutos verdes de <i>H. speciosa</i> colhidos no inverno. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média. ....	53
<b>Tabela 5:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 50°C por extrato aquoso das folhas de <i>H. speciosa</i> coletadas no verão. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	60
<b>Tabela 6:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 75°C por extrato aquoso das folhas de <i>H. speciosa</i> coletadas no verão. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	62
<b>Tabela 7:</b> Diâmetro hidrodinâmico ( <i>Z-Average</i> ), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 75°C por extrato aquoso das folhas de	

<i>H. speciosa</i> coletadas no verão. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	65
<b>Tabela 8:</b> Percentual de viabilidade celular de <i>Candida krusei</i> por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs e seus respectivos controles (Ctrl) dos extratos de 8 $\mu$ M e 4 $\mu$ M. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	79
<b>Tabela 9:</b> Percentual de viabilidade celular <i>in vitro</i> de fibroblastos por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs e seus respectivos controles (Ctrl) a 4 $\mu$ M. Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	80
<b>Tabela 10:</b> Percentagem da média de UFC/mL da linhagem de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ após incubação (a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 6 horas) contendo amostras de AgNPs e seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média.....	85
<b>Tabela 11:</b> Sumariação dos resultados obtidos referentes às sínteses e caracterizações das suspensões de AgNPs obtidas por síntese verde com frutos (casca, polpa e semente) e folhas de <i>Hancornia speciosa</i> . ....	91
<b>Tabela 12:</b> Sumarização dos resultados obtidos referentes aos testes de atividade biológica realizados com as suspensões de AgNPs obtidas por síntese verde com extratos dos frutos (casca, polpa e semente) e sementes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes. ....	92

## Lista de abreviatura e siglas

**Ag** – prata

**Ag<sup>+</sup>** – prata iônica

**Ag<sup>0</sup>** – prata reduzida

**AgNPs** – nanopartículas de prata

**AgNO<sub>3</sub>** – nitrato de prata

**Água Milli-Q** – água ultra pura

**ATP** – *adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

**Au** – ouro

**AuNPs** – nanopartículas de ouro

**Ctrl** – controle

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dubecco)

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – *desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

**DLS** – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

**NMPs** – nanopartículas metálicas

**MFA** – Microscopia de Força Atômica

**MIC** – *minimum inhibitory concentration* (concentração inibitória mínima)

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

**NIH** – *National Intitude of Health*

**NO** – óxido nítrico

**PdI** – *Polydispersity Index* (índice de polidispersividade)

**PET** – poli(tereftalato de etileno)

**pH** – Atividade do íon hidroxônio

**PVP** – polivinilpirrolidona

**RPMI 1640** – Roswell Park Memorial Institute 1640 (meio desenvolvido pelo instituto Roswell Park Memorial)

**ROS** – *reactive oxygen species* (espécies de oxigênio reativas)

**rpm** – rotações por minuto

**SPR** – surface plasmon resonance (ressonância plasmônica de superfície)

**UFC** – unidade formadora de colônia

**YEPD** – yeast extract peptone dextrose (meio de cultura com extrato de levadura, peptona e dextrose)

## Sumário

<b>Introdução</b> .....	<b>20</b>
<b>Motivação e Justificativa</b> .....	<b>26</b>
<b>Hipótese</b> .....	<b>26</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>27</b>
<b>Objetivo geral</b> .....	<b>27</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>28</b>
<i>Obtenção de extratos aquosos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes</i> .....	28
<i>Síntese verde de nanopartículas de prata com extratos de <i>H. speciosa</i></i> .....	29
<i>Caracterização de nanopartículas de prata produzidas com extratos de <i>H. speciosa</i></i> .....	30
<i>Imobilização de nanopartículas de prata em superfícies poliméricas</i> .....	31
<i>Dissolução das nanopartículas de prata obtidas por rota de síntese verde com extrato aquoso de <i>H. speciosa</i></i> .....	32
<i>Atividade biológica das nanopartículas de prata obtidas por rota de síntese verde com extratos aquosos de <i>H. speciosa</i></i> .....	33
<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>39</b>
<i>Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de <i>H. speciosa</i>: frutos maduros colhidos na estação do verão</i> .....	39
<i>Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de <i>H. speciosa</i>: frutos maduros colhidos na estação do inverno</i> .....	48
<i>Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de <i>H. speciosa</i>: frutos verdes colhidos na estação do inverno</i> .....	52
<i>Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos das folhas de <i>H. speciosa</i></i> .....	58

<i>Caracterização da superfície interna de preformas de poli(tereftalato de etileno) e imobilização de AgNPs em superfície polimérica.....</i>	<i>70</i>
<i>Atividade biológica de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de H. speciosa.....</i>	<i>77</i>
<b>Sumarização dos resultados.....</b>	<b>91</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>93</b>
<b>Produção científica .....</b>	<b>96</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>97</b>

## Introdução

Segundo *National Nanotechnology Initiative* um material em escala nanométrica é aquele que possui pelo menos uma de suas dimensões em tamanho de 1 a 100 nanômetros. A nanotecnologia, por sua vez, abrange a manipulação desses materiais nanoestruturados que refletem os efeitos da mecânica quântica. Assim, a nanotecnologia além de ser considerada uma área tecnológica é também uma categoria de pesquisa. Como proferiu Richard P. Feynman na conferência clássica do encontro anual da *American Physical Society* no *California Institute of Technology (Caltech)*: “Há muito espaço lá dentro”. E essa frase reflete na ampla gama de pesquisas e aplicações que lidam com as propriedades especiais da matéria que ocorrem em materiais em nanoescala.

A nanobiotecnologia é uma área da nanotecnologia relacionada à criação, à utilização e ao aprimoramento de nanoestruturas em processos biotecnológicos. Dentre os vários campos de pesquisa nessa área está a síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas e composições químicas. A síntese de nanopartículas metálicas (NPMs), por sua vez, entra nesse ramo de pesquisa. Nanopartículas de metais nobres como prata, ouro, platina e paládio tem despertado grande interesse devido ao pequeno tamanho e à grande área de superfície em relação ao seu volume. Nessa escala nanométrica, tais partículas passam a apresentar características muito diferentes de partículas maiores presentes do mesmo material em maior escala (AKHTAR, 2013).

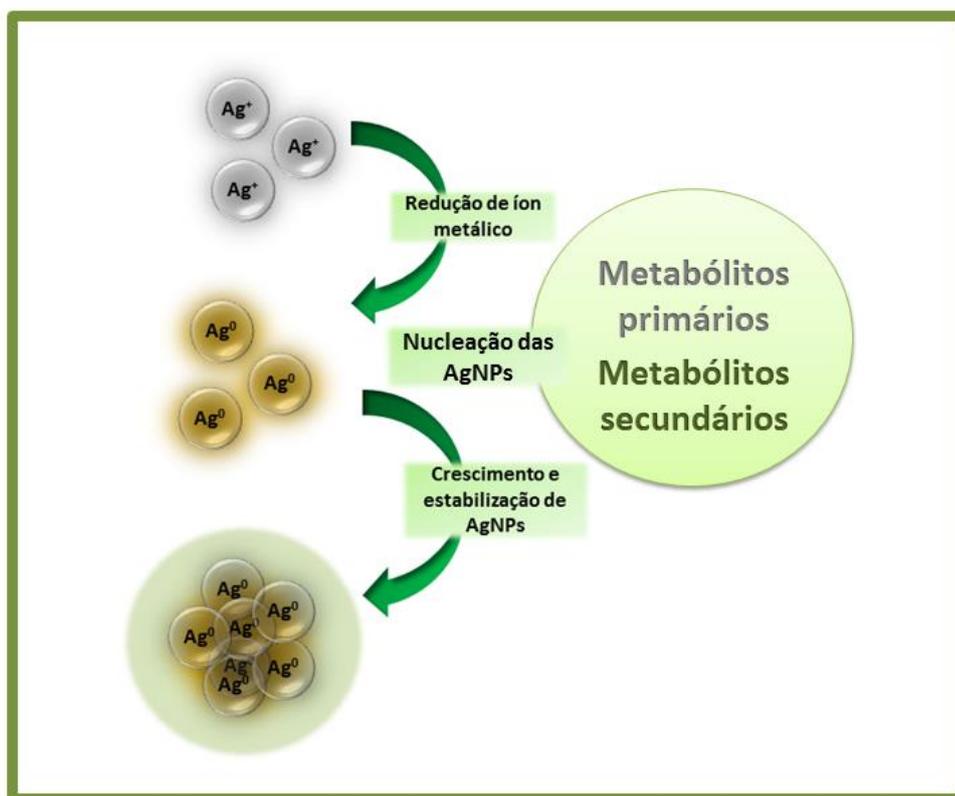
As nanopartículas de metais nobres podem ser aplicadas no campo da medicina, biologia, física, química e ciência dos materiais (KUMAR, 2014). As nanopartículas de ouro, por exemplo, estão presentes em técnicas de imagiologia combinada e terapia fototérmica de tumores (PUVANAKRISHNAN, 2012). As nanopartículas de platina podem ser encontradas na fabricação de sensores eletroquímicos (YANG, 2006). Em contrapartida, estudo mostra que nanopartículas de paládio possui capacidade eletrocatalítica (CHEN, 2010). Dentre as NPMs, as nanopartículas de prata (AgNPs) também podem ser aplicadas em várias áreas

como circuitos integrados, sensores, filtros, fibras, eletrodos celulares e agentes antimicrobianos. Assim, AgNPs tem conquistado o interesse de muitos pesquisadores. (IRAVANI, 2011). Isso ocorre devido às características de condutividade elétrica, à estabilidade química e às atividades catalítica e antibiótica das AgNPs (KUMAR, 2014). Além disso, estudos mostraram que AgNPs imobilizadas em superfícies podem ser utilizadas como suporte para imobilização de enzimas, assim como atribuir propriedade antimicrobiana a uma determinada superfície (KHAN, 2013; LI, 2005). A propriedade antimicrobiana das AgNPs torna essas nanoestruturas aplicáveis em diferentes áreas da medicina, da indústria, na pecuária e em outras áreas onde é preciso combater a proliferação desordenada de microrganismos. Estudos já realizados confirmam essa ação antimicrobiana das AgNPs contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphillis typhus* e *Staphylococcus aureus* (IRAVANI, 2011).

A síntese de NPMs é realizada por redução de um íon metálico. Os métodos tradicionais utilizados para a síntese dessas nanopartículas são geralmente métodos químicos em que há utilização de solventes tóxicos (hidróxido de sódio, hidrato de hidrazina, borohidreto de sódio, dimetilformamida e etilenoglicol), que podem, inclusive, ser adsorvidos na superfície das NPMs. Além disso, pode ocorrer geração de subprodutos perigosos e envolver consumo de alta energia. Devido a esses fatores, há uma necessidade crescente em se desenvolver procedimentos não tóxicos e não agressivos ao meio ambiente; porém com um rendimento alto e custo baixo. Nesse contexto, as rotas de síntese de NPMs por sistemas biológicos, também conhecidas como síntese verde ou biossíntese, tornam-se bastante relevantes. Nessas rotas de síntese, organismos biológicos ou partes deles, como biomoléculas, apresentam potencial redutor e, portanto, são utilizados para obtenção de NPMs. A biossíntese de NPMs é realizada tanto por organismos procarióticos como bactérias quanto eucarióticos como plantas, e é mediada por componentes biológicos capazes de reduzir

o íon metálico, sem a geração de resíduos tóxicos e sem impacto ao meio ambiente (IRAVANI, 2011; TAKKAR, 2010).

Plantas têm atraído a atenção de pesquisadores nos últimos 30 anos e têm sido sistematicamente exploradas para a biossíntese de NPMs. Nessas rotas de síntese são utilizados tecidos da planta, a planta viva ou extrato da planta (IRAVANI, 2011). A redução de um íon metálico por um extrato vegetal é conhecida desde o início do século XX, apesar do processo de redução ainda não ser claramente elucidado, e geralmente envolver a mistura de um extrato aquoso com a solução do íon metálico em questão (MITTAL, 2013). Entretanto, sabe-se que a biossíntese por plantas, em geral, é realizada por uma combinação de biomoléculas como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, além de metabólitos secundários como flavonoides, ácido tânico e terpenoides (AKTAR, 2013). Acompanhado desses redutores biológicos, o extrato também possui agentes estabilizantes das NPMs (Figura 1). A origem desses componentes redutores e estabilizantes influencia nas características das NPMs. Isso ocorre porque diferentes extratos apresentam concentrações e combinações diferentes desses compostos. Por envolver diferentes compostos, a biorredução é um processo relativamente complexo e pouco conhecido (MITTAL, 2013).



**Figura 1:** Esquema ilustrativo do princípio da síntese verde de NPMs utilizando plantas: íons prata são reduzidos e há a nucleação, crescimento e estabilização das nanopartículas formadas por metabólitos primários e/ou secundários da planta.

De fato, muitas hipóteses foram propostas para o mecanismo da biossíntese de NPMs por plantas. Em estudo recente, a avaliação por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas de ouro (AuNPs) obtidas por biossíntese com folhas de *Pelargonium graveolens* indicou a presença de terpenoides e proteínas nas amostras de AuNPs. Além disso, foi atribuído que a banda em  $1748\text{ cm}^{-1}$  do espectro de FTIR se refere ao grupo éster da clorofila. Esse estudo também sugeriu que a redução do íon metálico acontecia com a oxidação de grupos de álcool a grupos carbonila de terpenoides (SHANKAR, 2003). Também utilizando folhas de *P. graveolens*, foram obtidas nanopartículas de Ag, Au e Au-Ag. Nesse trabalho, um açúcar atuou como redutor dos íons metálicos, assim como metabólitos secundários (flavonoides e terpenoides) presentes nas folhas atuaram como estabilizantes das NPMs (SHANKAR, 2004).

Além da *P. graveolens*, outras plantas são utilizadas na biossíntese de NPMs. Em estudo com *Avena sativa* sua biomassa foi utilizada para a formação de AuNPs por meio da redução de íons Au (III). Várias formas (tetraédrica, hexagonal e em forma de haste) dessas AuNPs foram observadas. Além disso, foi demonstrado que o tamanho das nanopartículas foi influenciado pelo pH da reação de síntese (ARMENDARIZ, 2004). Folhas desidratadas de *Cinnamomum camphora* foram responsáveis pela formação de AuNPs e AgNPs, em que componentes de poliol participaram na redução dos íons metálicos e componentes heterocíclicos atuaram na estabilização das NPMs (HUANG, 2007). Em outro estudo, extrato de folhas de *Aloe vera* foi utilizado para formação extracelular de AuNPs e AgNPs de forma triangular e esférica, respectivamente. O tamanho das AuNPs variaram entre 50-350 nm ao passo que as AgNPs tiveram entre 11-19,4 nm (THAKKAR, 2010; CHANDRAN, 2006).

O bioma Cerrado é uma fonte rica e inexplorada de plantas as quais podem ser utilizadas como agentes biorredutores durante as rotas de síntese de NPMs. A *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira) é uma planta que se desenvolve principalmente em solos ácidos, com baixa fertilidade e em diferentes biomas como Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Figura 2). Essa planta faz parte da família Apocynaceae que é bastante encontrada no Cerrado brasileiro. (BARROS, 2010). A planta frutífera e arbóreo-arbustiva possui frutos com 11% de casca, 77% de polpa e 12% de semente, os quais são ricos em vitaminas A, B1, B2 e C, além de ferro, fósforo, cálcio e proteínas. Contudo, apenas a polpa do fruto possui aspecto comercial relevante devido ao seu valor nutritivo que é superior ao de outras frutas tropicais. Para cada 100 g de polpa são encontrados 90,7 g de proteínas além de ter valor energético de 43 calorias a cada 100 g da fruta (GOMES, 2010). Segundo Sampaio (2008), componentes fitoquímicos como ésteres, álcoois e furfural são predominantes na mangaba, o fruto da planta *H. speciosa*. Além disso, substâncias como ésteres 3-b-O-acil lupeol, triterpenos, éster diidroxilado 3-b-O-acil lupeol e sacarose na sua forma peracetilada

também estão presentes na planta tornando-a uma candidata em potencial para rotas de síntese verde de NPMs.



**Figura 2:** Planta adulta de mangabeira. Foto: Josué Francisco da Silva Junior.  
Fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mangaba/arvore/CONT000fmnuz01602wyiv80txmlleb7gc0wj.html>

Como já foi relatado, dentre as NPMs, as AgNPs tanto imobilizadas em superfícies quanto livres, apresentam várias propriedades, dentre elas a capacidade de combater microrganismos. Além disso, já foi demonstrado por diversos autores que essas nanoestruturas metálicas podem ser obtidas por biorredução realizada por compostos encontrados em inúmeros organismos, alguns dos quais também presentes em vegetais como *H. speciosa*. Nesse contexto, o presente estudo propõe a biossíntese, caracterização, imobilização e avaliação da atividade biológica de AgNPs em vários sistemas biológicos *in vitro*. A obtenção das AgNPs ocorrerá a partir da síntese realizada por componentes dos extratos da casca, da polpa e da semente de mangaba, assim como, a partir do extrato das folhas de mangabeira.

## Motivação e Justificativa

Muitos estudos já relataram que AgNPs apresentam diversas aplicações biológicas e biomédicas. Entre elas está a aplicação de AgNPs para controle microbiológico devido à sua propriedade antimicrobiana (IRAVANI, 2011). A exemplo disso, Gopinath (2012) demonstra que AgNPs apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias resistentes como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. O estudo ainda relata que essas AgNPs foram originadas de síntese por extrato do fruto de *Tribulus terrestris*. Além do efeito antimicrobiano das AgNPs livres em suspensão, um estudo de Li (2005) mostrou que AgNPs imobilizadas em uma superfície também apresentam atividade antimicrobiana.

Sabendo que a obtenção de AgNPs por síntese química gera vários resíduos tóxicos e danos ao meio ambiente, uma das propostas do presente estudo foi desenvolver uma rota simples, rápida e sustentável de AgNPs por síntese verde utilizando extratos de uma planta típica do Cerrado brasileiro. Além disso, como o efeito antimicrobiano é em geral observado tanto para AgNPs livres quanto imobilizadas em superfícies, foi também propósito avaliá-las em vários sistemas biológicos *in vitro*, visto que as AgNPs podem ser uma alternativa para o controle de microrganismos patogênicos e pragas. Adicionalmente, as AgNPs sintetizadas devem ser imobilizadas em superfície de poli (tereftalato de etileno) – PET com o intuito de obter uma nova alternativa de reutilização de garrafas PET para eventual controle de larvas de insetos, assim como em microtubos de polipropileno.

## Hipótese

Extratos aquosos oriundos dos frutos e das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes são capazes de reduzir e estabilizar a prata iônica formando nanopartículas de prata (AgNPs), e essas por sua vez, são capazes de ter efeito antibiótico?

## Objetivos

### Objetivo geral

Obter AgNPs por biossíntese com extrato da casca, da polpa e da semente do fruto e das folhas de *Hancornia speciosa*, imobilizar as AgNPs sintetizadas em superfície polimérica e avaliar a atividade biológica das AgNPs livres e imobilizadas.

### Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs utilizando extratos de frutos (casca, polpa e sementes) e folhas de *Hancornia speciosa*;
- Aperfeiçoar as condições de síntese de AgNPs com extratos de *H. speciosa*;
- Caracterizar quanto ao tamanho, forma, carga de superfície e condutividade elétrica as AgNPs obtidas por biossíntese com extratos de *H. speciosa*;
- Realizar imobilização de AgNPs em superfície polimérica de poli (tereftalato de etileno) e polipropileno;
- Avaliar a atividade *in vitro* das AgNPs nos seguintes sistemas biológicos: bactérias, fungos filamentosos, leveduras, hemácias, fibroblastos, nematoides e larvas de inseto.

## **Materiais e Métodos**

### *Obtenção de extratos aquosos de *Hancornia speciosa* Gomes*

As sínteses de AgNPs foram realizadas com os extratos de frutos de mangabeira nas seguintes condições: maduros coletados em estações distintas (verão = período das chuvas e inverno = período da seca) e verdes coletados no inverno. Além dos frutos, as folhas também foram utilizadas como matéria prima para obtenção do extrato utilizado como agente redutor de íons prata.

Frutos e folhas de mangaba foram coletados em área de cerrado em propriedade particular localizada no município de Colinas do Sul, Goiás, entre os meses de setembro e dezembro do ano de 2013 (verão) e de junho do ano de 2014 (inverno), sendo armazenados a -20°C até o momento da utilização. A síntese verde por mangaba e mangabeira foi realizada a partir de três extratos dos frutos (extrato da casca, extrato da polpa e extrato da semente) e extrato das folhas, tendo a água como solvente. Para a preparação dos extratos das partes do fruto, a casca, a polpa e a semente foram separadas. A casca foi retirada utilizando um bisturi que permitiu a realização de cortes finos nos frutos ainda congelados. A polpa foi isolada após a extração das sementes as quais foram, posteriormente, completamente separadas de fragmentos da polpa. Nesse processo de lavagem, as sementes foram colocadas em água potável durante diversas lavagens, sempre sob agitação constante em agitador magnético modelo Q261-22 (Quimis); foram enxaguadas e lavadas novamente com detergente neutro Extran a 0,1%. Após novo enxágue, as sementes foram submetidas a uma sequência de lavagens com água destilada e Extran a 0,1% sob agitação, enxaguadas com água destilada e lavadas com água destilada sob agitação. As sementes obtidas foram colocadas em papel toalha para secar a temperatura ambiente. As folhas foram lavadas com água potável em abundância e colocadas em Extran a 0,1% por 3 minutos. Posteriormente, as folhas foram submetidas a três enxágues com água destilada. Após o processo de lavagem, as folhas foram deixadas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora.

Cada parte do fruto foi pesada individualmente em balança modelo BK 300 (Quimis), obtendo-se a proporção aproximada de 21%, 68% e 11% de casca, polpa e semente respectivamente. As folhas foram cortadas com tesoura cirúrgica e pesadas na mesma balança. As partes obtidas foram colocadas em água Milli-Q em ebulição em placa de aquecimento modelo 0261-22 (Quimis), separadamente, em béqueres de vidro. O volume de água Milli-Q para decocção de cada parte do fruto e das folhas variou conforme o peso de cada parte do fruto (casca, polpa ou semente) e das folhas de maneira a obter uma concentração final de 0,1 g/mL (100 mg/mL) de extrato. A extração por decocção foi realizada em um período de 3 minutos com agitação em agitador magnético macro com placa de aquecimento, modelo 0261-22 (Quimis). Os extratos foram recuperados por filtração em erlenmeyers e posteriormente armazenados em tubos tipo *falcon* de 50 mL, à temperatura de 4°C e protegidos da luz até o momento de serem utilizados para síntese de NPMs, a qual ocorreu no mesmo dia da preparação dos extratos.

#### *Síntese verde de nanopartículas de prata com extratos de H. speciosa*

As sínteses foram realizadas, primeiramente, em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato e monitoradas em leitora de microplacas Biotek 808x IU, à temperatura ambiente (25°C). A medição da absorvância foi realizada nos comprimentos de onda de 405 nm, 450 nm e 630 nm em intervalos de 10 minutos. As amostras foram preparadas em duplicata e em cinco concentrações diferentes de cada extrato (50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; e 3,125 mg/mL), conforme Tabela 1. Essas concentrações foram obtidas por diluição seriada a partir da concentração inicial dos extratos (0,1 g/mL). Para a formação das nanopartículas de prata foi utilizado nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) para uma concentração final no meio reacional de 1 mM. As amostras destinadas à formação de NPMs continham extrato nas diferentes concentrações e solução inicial de  $\text{AgNO}_3$  à 2 mM na proporção 1:1. Os controles referentes a cada concentração dos extratos continham água

Milli-Q ao invés de AgNO<sub>3</sub> em solução. A concentração de extrato das amostras de AgNPs e dos respectivos controles são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Concentrações de extratos da casca, polpa ou semente e folhas de *H. speciosa* nas amostras de nanopartículas de prata e em seus respectivos controles (contendo somente os extratos).

Concentração do extrato	Amostra	Controle
50 mg/mL (1)	AgNPs_50	Controle_50
25 mg/mL (2)	AgNPs_25	Controle_25
12,5 mg/mL (3)	AgNPs_12	Controle_12
6,25 mg/mL (4)	AgNPs_6	Controle_6
3,125 mg/mL (5)	AgNPs_3	Controle_3

Para a otimização da síntese de AgNPs, foram utilizados os extratos das folhas em condições reacionais de temperaturas mais elevadas, em tempos diferentes, sendo que os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio de vidro com capacidade para 10 mL. Na temperatura de 50°C, a síntese ocorreu durante 24 horas e foram utilizadas as concentrações de extrato a 50 mg/mL e 3 mg/mL. Na temperatura de 75°C, as cinco concentrações seriadas foram avaliadas no mesmo intervalo de tempo (24 horas) e somente a concentração do extrato a 6,25 mg/mL foi utilizada na síntese com duração de 12 horas. Tais sínteses foram realizadas em banho-maria microprocessado, modelo Q334M (Quimis).

A síntese escolhida para monitoramento da cinética de formação de AgNPs em temperatura mais elevada foi a síntese realizada a temperatura de 75°C na concentração de 6,25 mg/mL de extrato aquoso das folhas. Esse monitoramento foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm.

#### *Caracterização de nanopartículas de prata produzidas com extratos de H. speciosa*

As amostras de AgNPs foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade (PDI) e por potencial Zeta de superfície para determinação da carga de superfície. Para cada amostra

diluída 1:5 foram realizados três ciclos de leitura em modo automático (duração indeterminada) em equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern) operando em um ângulo de 173°. Após as análises de DLS-Zeta, cinco amostras de AgNPs obtidas de extratos do fruto maduro foram selecionadas, duas referentes ao extrato da casca (AgNPs\_25 e AgNPs\_6), uma referente ao extrato da polpa (AgNPs\_12) e duas referentes ao extrato da semente (AgNPs\_6 e AgNPs\_3). Além dessas, as AgNPs obtidas com as folhas de mangabeira na concentração de extrato a 6,25 mg/mL também foram submetidas a outras caracterizações. A forma e altura das estruturas presentes nas amostras foram determinadas por microscopia de força atômica (MFA) utilizando um microscópio SPM-9600 (Shimadzu). As imagens com área de varredura de 100  $\mu\text{m}^2$  foram adquiridas em modo dinâmico com resolução de 512  $\times$  512 linhas e frequência de 1 Hz utilizando ponteiros cônicos de silício integradas com cantilevers retangulares com 100  $\mu\text{m}$  de comprimento com constante de mola de aproximadamente 42 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 300 kHz.

A medição da condutividade elétrica das amostras do fruto maduro (verão) selecionadas foi realizada, após diluição 1:5, utilizando um condutivímetro microprocessado de bancada modelo Q795M2. Foi considerada a condutividade elétrica expressa após 10 segundos de contato da amostra em cubeta plástica com o eletrodo. A condutividade elétrica das demais amostras foi medida simultaneamente com as medidas de potencial Zeta de superfície. Além disso, a curva de absorção das amostras também foi adquirida utilizando um espectrofotômetro UV-Vis mini modelo 1240 (Shimadzu) na faixa de comprimentos de onda de 350 a 550 nm, para determinação do comprimento de onda em que as nanopartículas mais apresentam efeito de ressonância plasmônica de superfície (máximo de absorção).

#### *Imobilização de nanopartículas de prata em superfícies poliméricas*

A imobilização das AgNPs foi realizada em superfície de poli (tereftalato de etileno), conhecido como PET, e em uma superfície de polipropileno. A imobilização foi realizada

mediante formação e adsorção de nanopartículas na superfície interna de preformas (tubos plásticos que originam garrafas PET utilizadas para armazenar líquidos carbonatados) e microtubos (tipo *ependorf* de 1,5 mL) durante a síntese. Esta foi realizada com extrato de folhas a 6,25 mg/mL a 75°C durante 24 horas. Para os recipientes de PET, foi realizada previamente a caracterização topográfica de superfície interna de preformas PET de três cores distintas, assim como, avaliadas as propriedades mecânicas por meio de espectroscopia de força. Três recipientes constituídos por polímero PET foram analisados: um incolor e dois pigmentados (verde e preto). Cada recipiente foi seccionado com auxílio de lâmina de bisturi aquecida e fragmentos com até 1 cm<sup>2</sup> foram analisados. As propriedades topográficas e mecânicas foram analisadas por microscopia de força atômica. Para isso, cinco aquisições com 100 µm<sup>2</sup> de cada área do tubo – perto do bocal (área 1), parte intermediária (área 2) e fundo do tubo (área 3) – foram adquiridas para análises de parâmetros de rugosidade e 25 curvas de força foram medidas para análise de parâmetros mecânicos. A varredura das áreas foi realizada no modo contato com resolução de 512 × 512 linhas e frequência de 1 Hz com ponteiros piramidais de nitreto de silício integradas com cantilevers triangulares de 200 µm de comprimento com constante de mola de aproximadamente 0,15 N/m.

Após o conhecimento das propriedades de nanorugosidade e nanomecânicas dos tubos PET e imobilização das AgNPs, a área 3 da superfície interna das preformas PET incolores foram submetidas à caracterização com as mesmas técnicas de MFA descritas.

#### *Dissolução das nanopartículas de prata obtidas por rota de síntese verde com extrato aquoso de *H. speciosa**

O teste de dissolução de AgNPs foi realizado com as AgNPs obtidas após síntese com extrato da folhas de *H. speciosa* a 6,25 mg/mL. O monitoramento foi realizado por espectroscopia de absorvância na região do visível no comprimento de onda de 405 nm por 48 horas à temperatura ambiente. A tentativa de dissolver as AgNPs foi conduzida em meio

reacional com ácido nítrico a 65%, o qual foi diluído para o ensaio, tendo a concentração final de 0,5 ou 2 mM. O teste foi realizado em microplaca de poliestireno em que cada poço continha a proporção 1:1 de amostra de AgNPs e HNO<sub>3</sub>. Os controles referentes ao extrato e a amostra de AgNPs foram colocados na mesma proporção (extrato/AgNPs e água).

*Atividade biológica das nanopartículas de prata obtidas por rota de síntese verde com extratos aquosos de H. speciosa*

A investigação das possíveis atividades biológicas das AgNPs foi realizada com nanopartículas livres e imobilizadas em polímeros. As nanopartículas livres selecionadas referentes à síntese com fruto foram as mesmas partículas caracterizadas por MFA - duas amostras referentes ao extrato da casca (AgNPs<sub>25</sub> e AgNPs<sub>6</sub>), uma referente ao extrato da polpa (AgNPs<sub>12</sub>) e duas referentes ao extrato da semente (AgNPs<sub>6</sub> e AgNPs<sub>3</sub>). Estas foram avaliadas quanto à possível atividade biológica em teste de susceptibilidade de fungos filamentosos e em avaliação de viabilidade celular de levedura e fibroblasto com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Quanto as partículas oriundas da síntese com extrato aquoso da folha, apenas as AgNPs<sub>6</sub> (referentes a concentração de 6,25 mg/mL do extrato aquoso) foram submetidas aos testes de atividade. Esses testes incluem: avaliação da viabilidade celular de levedura e da mortalidade de nematoides com MTT, avaliação da atividade de bactérias por microdiluição, teste de hemólise e possível atividade larvicida e nematicida das nanopartículas. As AgNPs<sub>6</sub> imobilizadas em microtubos de polipropileno e em preformas de PET foram testadas contra fitonematoides e larvas de inseto, respectivamente.

O ensaio de susceptibilidade foi realizado contra o fungo *Fusarium oxisporum* (fitopatógeno) – coleção do laboratório de enzimologia da Universidade Federal de Goiás e com *Trichophyton mentagrophytes* (dermatófito). Esse teste foi realizado por microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços com concentração de 10<sup>3</sup> células por poço. Cada poço

continha células em 50 µL de meio RPMI 1640 nos quais foram misturados 50 µL de suspensão contendo AgNPs (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_AgNPs\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3) ou AgNO<sub>3</sub> em concentrações variadas (128 a 0,25 µM – equivalente à prata livre), sendo as mesmas concentrações avaliadas no controle. A microplaca foi incubada no escuro à temperatura ambiente (~ 25°C) no teste com *F. oxisporum* por 48 horas e por apenas 5 horas no teste com *T. mentagrophytes*. A verificação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada por inspeção visual. As microplacas foram incubadas por mais cinco dias, tanto com *F. oxisporum* quanto com *T. mentagrophytes* para verificação da concentração inibitória mínima (MIC) fungicida.

O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicata com a levedura *Candida krusei* (inscrita junto a World Federation for Culture Collection sob o número WDCM 1056) e com fibroblastos da linhagem NIH 3T3 (fibroblastos de embriões de rato Swiss albino). O teste de mortalidade com nematoide foi realizado com o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*.

O ensaio com *C. krusei* foi realizado em microtubos de polipropileno tipo *ependorf*, em que cada um continha uma suspensão com aproximadamente  $9 \times 10^8$  células (correspondente a 0,6 de absorvância espectrofotométrica) em 180 µL de meio YEPD. O ensaio com fibroblasto foi realizado em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços, onde cada poço tinha  $5 \times 10^3$  células em 100 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Em cada condição foram adicionados 20 µL de cada amostra (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3) e de cada controle (referentes ao extrato). As amostras de AgNPs e os controles foram testados nas concentrações de 4 µM e 8 µM (equivalente em concentração de prata livre) no ensaio com levedura *C. krusei* e na concentração de 4 µM no ensaio com fibroblastos. Após esse processo os microtubos contendo as leveduras foram incubados a 28°C por 3 horas e os fibroblastos foram incubados a 37°C por 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O MTT

utilizado no ensaio foi misturado com meio de cultura DMEN para os fibroblastos e com meio de cultura YEPD para as leveduras na proporção 1:10. O volume de 150 µL dessa solução foi adicionado em cada poço ou microtubo. As amostras, por sua vez, foram incubadas novamente por 2 horas (nas mesmas condições peculiares a cada tipo celular) e posteriormente centrifugadas a 128 g por 3 minutos para a precipitação das leveduras, sendo que fibroblastos dispensaram essa etapa por serem células aderentes. Em seguida, 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) foram adicionados ao precipitado de células (*C. krusei*) ou às células aderentes (fibroblastos) para diluição dos cristais de formazan formados nas células viáveis e posterior leitura das amostras em microplaca de 96 poços por método espectrofométrico nos comprimentos de onda 630 nm e 595 nm para *C. krusei* e fibroblastos, respectivamente.

O teste de mortalidade por MTT com *C. elegans* foi realizado utilizando nematoides incubados previamente à temperatura de 20°C em placa com 24 poços na concentração de 200 nematoides por mL. As amostras e seus respectivos controles com extrato aquoso de folhas foram adicionados aos poços com os nematoides nas concentrações de 100 µM, 10 µM e 1 µM. Após 24 horas, as placas foram submetidas à centrifugação de 800 g por 10 minutos e 800 µL de sobrenadante foram retirados de cada poço, restando apenas 200 µL. Tal procedimento foi realizado 2 vezes com a adição de solução salina para a lavagem dos nematoides. Os 200 µL restantes na placa contendo os nematoides foram homogeneizados e transferidos para microplaca de 96 poços num volume de 150 µL. A solução de MTT previamente preparada foi adicionada em cada poço num volume de 150 µL. A homogeneização foi realizada novamente com auxílio de pipeta multicanal e placa foi incubada a 20°C protegida da luz por 3 horas. Posteriormente, a placa foi submetida a procedimento de centrifugação a 800 g por 10 min e 150 µL de sobrenadante foram substituídos por DMSO no mesmo volume. Realizou-se nova homogeneização e leitura espectrofotométrica após 10 minutos no comprimento de onda de 570 nm.

O teste de atividade bacteriana por microdiluição foi realizado com *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (linhagem mantida em LB líquido e glicerol estéril na proporção 1:5). Para o ensaio, as colônias de *E. coli* foram isoladas em placa de Petri com meio LB sólido (Invitrogen) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12-16 horas, e posteriormente armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após o isolamento das colônias, uma delas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contido em tubo de polipropileno, de 50 mL (tipo *falcon*), em duplicata. Os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12-16 horas sob agitação de 200 rpm. Após esse processo, 50 mL do pré-inóculo foi diluído em 5 mL de meio LB líquido e nova incubação foi realizada por 6 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após essa preparação, a concentração das bactérias para o ensaio foi determinada por absorbância máxima de 0,1 (OD 600). O inóculo foi de 100  $\mu\text{L}$  em 5 mL de meio LB líquido contendo as amostras de AgNPs ou controles, sendo o controle negativo com água, o controle positivo com ampicilina a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , além do  $\text{AgNO}_3$  e do extrato na mesma concentração das amostras. Por fim, diluições fracionadas com solução fisiológica estéril foram realizadas até atingir  $10^6$  bactérias/mL. Estas foram aplicadas em placas de Petri, contendo meio LB sólido, as quais foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12-16 horas. As UFC/mL foram quantificadas por ponto.

O teste hemolítico com AgNPs\_6 de extrato das folhas foi realizado com concentrado de hemácias de origem bovina na concentração de 8% (v/v) em solução salina (solução de cloreto de sódio a 0,9%). As amostras de AgNPs foram submetidas a diluição seriada com solução salina obtendo-se várias concentrações (de 256 a 0,25  $\mu\text{M}$ ). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços na proporção 1:1 em cada poço. Após homogeneização a placa foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  com agitação de 390 rpm por 30 minutos. A placa foi submetida a procedimento de centrifugação a 900 g, a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos em centrífuga Marathon 3000 R, modelo 220 – 240 (Fisher Scientific). Como não houve coagulação após esse processo, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca de 96 poços para a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

Além desses ensaios, foram realizados testes de atividade biológica das AgNPs\_6 em fitonematoide *Meloidogyne incognita* e larvas de inseto *Aedes aegypti*. Foram testadas tanto as AgNPs livres quanto as imobilizadas em polímeros. Para o ensaio com os fitonematoides, foram utilizados *M. incogta* juvenis de 2º estágio (fase em que o fitonematoide penetra na raiz da planta) oriundos de 6ª eclosão de ovos. A quantidade de nematoides em meio líquido foi de 62 nematoides/mL. Para o ensaio com as AgNPs livres em cada microtubo de 1,5 mL havia 500 µL desse concentrado juntamente com 100 µL de AgNPs e seus respectivos controles nas concentrações 100, 10, 1 e 0,1 µM para o volume final de 600 µL. Para o ensaio com as AgNPs imobilizadas, como estas já estavam adsorvidas na parede interna dos microtubos, foi adicionado 1 mL do concentrado de nematoides na mesma quantidade (62 nemtóides/mL) em cada um. O ensaio foi realizado em triplicata, com os controles positivos (com álcool a 2%) e controles negativos (com água destilada) na proporção referente a cada ensaio. Após 24 horas a temperatura ambiente, foi realizada a contagem dos nematoides em movimento e paralisados em placa de Peyer por meio de microscópio de luz Axiophot (Zeiss) com objetiva de 10×. As amostras que apresentaram nematoides paralisados foram separadas para nova análise denominada análise (ensaio) de recuperação. Para isso, foram submetidos a três lavagens com água destilada seguidas de centrifugação a 3000 g por 3 minutos em microcentrífuga Minispin (Eppendorf). A quantidade de sobrenadante retirada foi equivalente ao volume de nematoide adicionado em cada ensaio. Os nematoides foram colocados em repouso a temperatura ambiente na presença de água destilada por aproximadamente 24 horas. Na segunda contagem, definiram-se os nematoides como vivos (em movimento) ou como mortos (paralisados) e finalizaram-se esses ensaios.

O teste de atividade biológica das AgNPs contra larvas de inseto *A. aegypti* também foi realizado com partículas livres e imobilizadas. Para as amostras de AgNPs livres, as larvas de quarto estágio (último estágio larval) foram distribuídas em copos plásticos descartáveis na proporção de 9 mL de água destilada e 1 mL de amostra e seus respectivos controles em

concentração final de 100, 10 e 1  $\mu\text{M}$  . Para os tubos com as partículas imobilizadas, foram colocados apenas 10 mL de água destilada. A distribuição das larvas foi realizada de forma que o tamanho das larvas fosse equivalente entre as amostras com 10 unidades em cada recipiente. O ensaio foi realizado a temperatura ambiente com observações de movimento das larvas a olho nú (inspeção visual) nos intervalos de 24 e 48 horas.

## Resultados e Discussão

*Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de H. speciosa: frutos maduros colhidos na estação do verão*

Sampaio e Nogueira (2006) realizaram a avaliação da composição química de frutos de *H. speciosa* e relataram diferenças significativas nos constituintes moleculares de frutos em diferentes estágios de maturação. Nos frutos verdes foi encontrado um maior teor de monoterpenos oxigenados (51%), como por exemplo, linalol,  $\alpha$ -terpeneol e geraniol, enquanto os teores de ésteres (6,5%), álcoois (18,4%), aldeídos (5,9%) e cetonas (0,5%) são reduzidos. Nos frutos maduros foram identificados ésteres (40,9%), álcoois (18,4%), aldeídos (10,2%) e cetonas (9,7%). O teor de monoterpenos oxigenados encontrados nos frutos maduros foi reduzido (1,9%) (SAMPAIO e NOGUEIRA, 2006).

Nas folhas de exemplares dessa espécie, Santos (2006) demonstraram a presença de monoterpenos oxigenados, sendo o geraniol,  $\alpha$ -terpineol e o linalol os compostos encontrados majoritariamente. Edringer (2007) isolou o inositol L- (+) bornesitol e o flavonoide rutina.

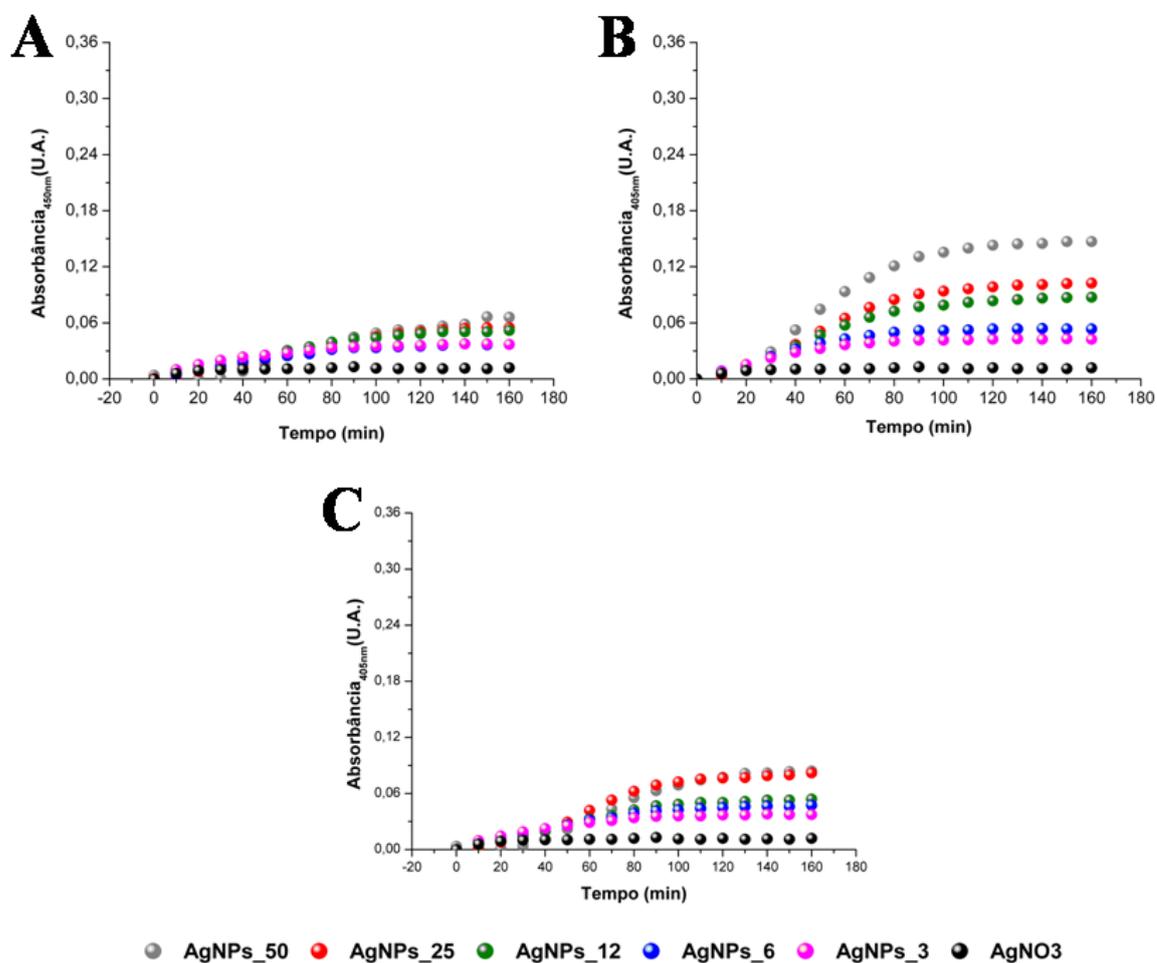
Considerando esse contexto de composições diferenciais dos frutos em estágios de maturação distintos e das folhas de *H. speciosa*, o presente estudo investigou as propensões de extratos obtidos desses sistemas para a síntese verde de AgNPs a partir dos extratos de frutos (casca, polpa e sementes) e folhas de *H. speciosa*.

Outro aspecto importante que deve ser considerado para o acompanhamento das reações de síntese é o monitoramento da formação das nanopartículas por meio de espectrofotometria. De acordo com a literatura, a confirmação preliminar para a formação de NPMs é realizada tipicamente por espectroscopia na região do visível. Isso porque essas nanopartículas formadas após síntese verde apresentam ressonância plasmônica de superfície que originam picos característicos em absorções no espectro eletromagnético (BAKER, 2013). Assim, o comprimento de onda de 405 nm foi selecionado para análise da possível

síntese de AgNPs por extratos de *H. speciosa*. Isso porque a curva de absorção óptica na região do visível, obtida por meio de síntese das AgNPs à temperatura de 75°C por duas concentrações de cada extrato, apresentou pico de absorbância máxima próximo a faixa de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das AgNPs, 420 nm de absorbância, como já reportado em outros trabalhos (RASTEGARZADEH, 2014; AKHTAR, 2013; BAKER, 2013). As pequenas variações de SPR podem ser justificadas por pequenas mudanças na forma e no tamanho das nanopartículas. Segundo Noguez (2007), a intensidade e a SPR própria da NPM é determinada por seu tamanho e por sua morfologia.

A SPR pode ser compreendida como um fenômeno que ocorre quando a luz polarizada atinge um filme ou conjuntos de NPMs na interface dos meios com diferentes índices de refração. Essas técnicas excitam e detectam oscilações coletivas de elétrons livres (conhecidas como *plasmons* de superfície), no qual a luz é incidida sobre as NPMs e a reflexão posterior é detectada (LIU, 2012).

Inicialmente, o monitoramento da síntese de AgNPs foi realizado a partir de extratos da casca, polpa e semente do fruto de *H. speciosa* colhidos na estação do verão, que corresponde ao período das chuvas na região Centro-Oeste. Esse processo teve duração de aproximadamente duas horas e trinta minutos até atingir um platô indicativo de máxima biorredução. A Figura 3 mostra esse monitoramento por espectroscopia de absorbância na região do visível no comprimento de 405 nm. As curvas foram plotadas a partir de normalização dos dados referente ao menor valor de absorbância de cada síntese. Nesse contexto, os gráficos da Figura 3 apresentam indícios de pouca a moderada formação de AgNPs devido ao discreto, ainda que expressivo, aumento na absorbância, principalmente nas curvas referentes às sínteses realizadas com extrato da polpa; nas amostras AgNPs\_50, AgNP\_25 e AgNP\_12. A utilização de outras técnicas de caracterização, como por exemplo, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia de força atômica (MFA) foram também utilizadas para verificação da formação de AgNPs.



**Figura 3:** Síntese de AgNPs por extratos aquosos do fruto maduro de *H. speciosa* monitorada por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 2,5 horas. A biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e sementes do fruto de manga coletados no verão referem-se às letras A, B e C, respectivamente.

Dentre as caracterizações das nanopartículas, as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), cargas de superfície (potencial Zeta) e condutividade elétrica foram utilizadas para as caracterizações preliminares. Assim sendo, todas as amostras de AgNPs

obtidas pelas rotas de síntese foram submetidas a essas abordagens experimentais. A partir dos resultados obtidos por DLS, algumas amostras foram selecionadas (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_AgNPs\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3) para a caracterização por MFA e testes de atividade biológica. Essas amostras foram selecionadas por apresentarem maior homogeneidade quanto ao tamanho das nanopartículas quando comparadas às outras amostras.

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que a diminuição na concentração de extratos das diferentes partes do fruto, resultou em uma tendência de redução dos valores de diâmetro hidrodinâmico e também condutividade elétrica. A mesma tendência foi verificada em relação aos resultados apresentados para o parâmetro índice de polidispersividade (PDI), que relaciona-se com a homogeneidade de dimensão das partículas obtidas.

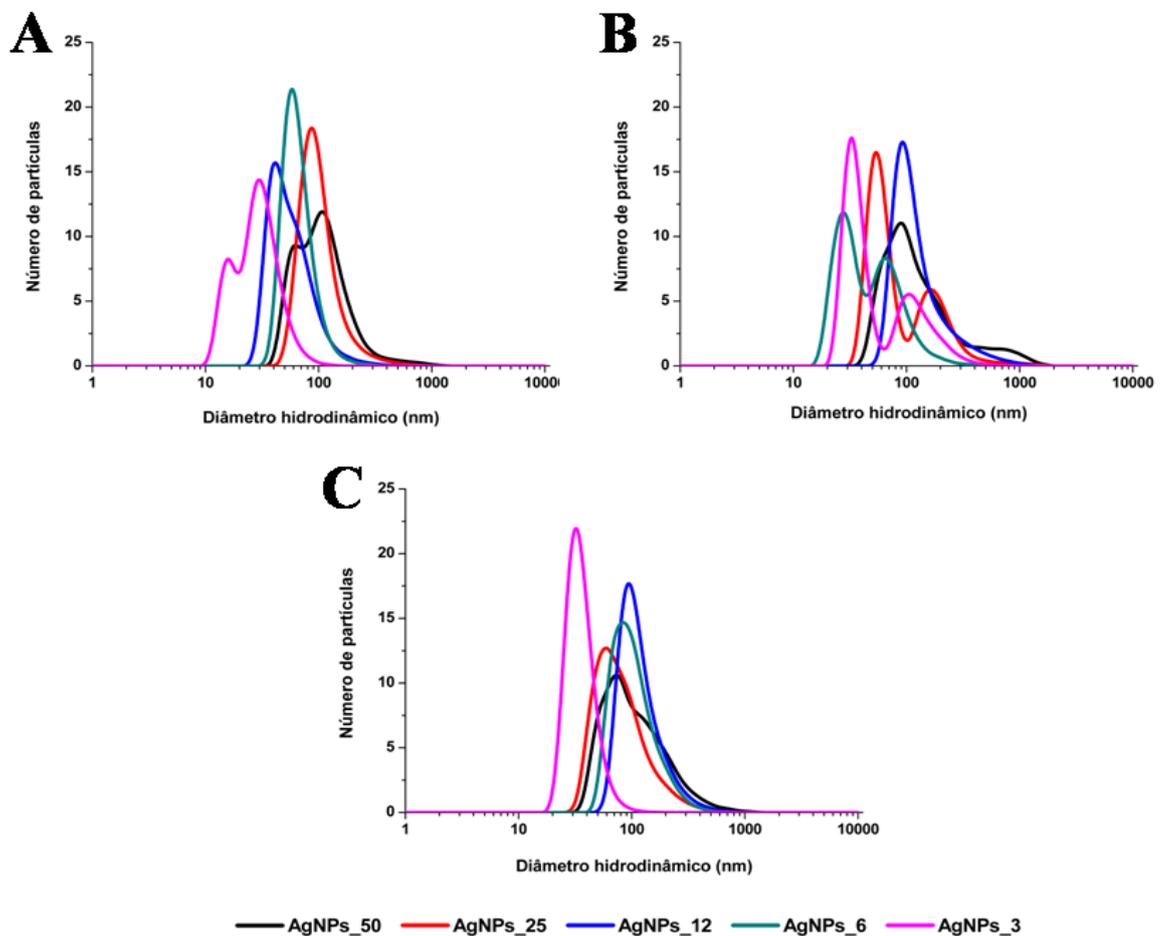
A amostra de AgNPs com menor concentração de extrato referente a casca foi a que apresentou carga de superfície mais negativa com aproximadamente -25 mV, sendo a mais negativa dentre todas as amostras de AgNPs, conferindo a elas uma maior estabilidade coloidal com relação às outras amostras. Além disso, os perfis das cargas superficiais das AgNPs foram semelhantes entre os extratos da casca e da semente, e expressivamente diferente nas AgNPs com extrato da polpa, na medida de condutividade elétrica. Esse evento (Figura 3) pode ser novamente relacionado com a possibilidade de diferenças fitoquímicas entre partes do fruto conforme previamente descrito para outras espécies de plantas por outros autores (KUMAR e YADAV, 2008).

A caracterização das AgNPs por espalhamento de luz dinâmico, em relação ao número de partículas, forneceu o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs com variação entre 20 nm e 150 nm aproximadamente. Na Figura 4 pode ser observado que as amostras de AgNPs obtidas por síntese com extrato da casca do fruto e da semente apresentaram populações mais homogêneas quando comparadas às partículas sintetizadas com o extrato da polpa do fruto. Além disso, nota-se que a amostra com maior população de partículas menores (com

aproximadamente 40 nm), apresentando uma distribuição mais homogênea, refere-se ao extrato da semente e está presente na amostra que possui menor concentração de extrato (Semente\_AgNPs\_3).

**Tabela 2:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta de superfície e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos de *H. speciosa* em cinco concentrações do extrato da casca, polpa e semente dos frutos maduro colhidos no verão. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Casca</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. Elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	360,37 $\pm$ 10,77	0,482 $\pm$ 0,045	-16,0 $\pm$ 0,0	122,67 $\pm$ 0,33
AgNPs_25	386,23 $\pm$ 35,54	0,422 $\pm$ 0,011	-18,9 $\pm$ 0,2	85,87 $\pm$ 0,17
AgNPs_12	327,77 $\pm$ 14,19	0,396 $\pm$ 0,046	-21,2 $\pm$ 0,6	62,07 $\pm$ 0,67
AgNPs_6	174,80 $\pm$ 4,96	0,357 $\pm$ 0,032	-23,4 $\pm$ 1,7	53,10 $\pm$ 1,90
AgNPs_3	203,77 $\pm$ 16,51	0,338 $\pm$ 0,015	-25,6 $\pm$ 0,9	39,37 $\pm$ 0,18
<b>Polpa</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. Elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	733,87 $\pm$ 16,69	0,700 $\pm$ 0,065	-10,8 $\pm$ 0,4	161,67 $\pm$ 0,33
AgNPs_25	531,37 $\pm$ 14,73	0,615 $\pm$ 0,074	-13,7 $\pm$ 0,3	108 $\pm$ 0,00
AgNPs_12	537,77 $\pm$ 65,06	0,586 $\pm$ 0,048	-16,1 $\pm$ 0,7	74,83 $\pm$ 1,01
AgNPs_6	334,47 $\pm$ 16,07	0,621 $\pm$ 0,083	-18,5 $\pm$ 1,5	53,63 $\pm$ 0,24
AgNPs_3	316,70 $\pm$ 22,26	0,477 $\pm$ 0,098	-15,1 $\pm$ 1,7	40,53 $\pm$ 0,23
<b>Semente</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. Elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	375,93 $\pm$ 15,95	0,493 $\pm$ 0,025	-15,8 $\pm$ 0,5	126,67 $\pm$ 0,67
AgNPs_25	302,20 $\pm$ 9,37	0,444 $\pm$ 0,009	-19,4 $\pm$ 0,3	76,80 $\pm$ 0,35
AgNPs_12	315,17 $\pm$ 5,98	0,421 $\pm$ 0,032	-19,3 $\pm$ 1,0	70,50 $\pm$ 0,10
AgNPs_6	332,12 $\pm$ 8,92	0,442 $\pm$ 0,031	-20,4 $\pm$ 0,9	52,64 $\pm$ 0,23
AgNPs_3	273,47 $\pm$ 22,26	0,380 $\pm$ 0,035	-22,9 $\pm$ 1,7	38,40 $\pm$ 0,23



**Figura 4:** Determinação do diâmetro hidrodinâmico (número - %) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas por extratos de *H. speciosa* coletados na estação verão. Onde: A refere-se às AgNPs provenientes da síntese com extrato da casca do fruto, B às AgNPs da síntese com extrato da polpa do fruto e C às AgNPs da síntese com extrato das sementes.

Nesse contexto, esta e outras amostras foram selecionadas para os testes subsequentes seguindo o mesmo princípio do padrão de distribuição de partículas, sendo elas: duas referentes ao extrato da casca (Casca\_AgNPs\_25 e Casca\_AgNPs\_6), uma referente ao

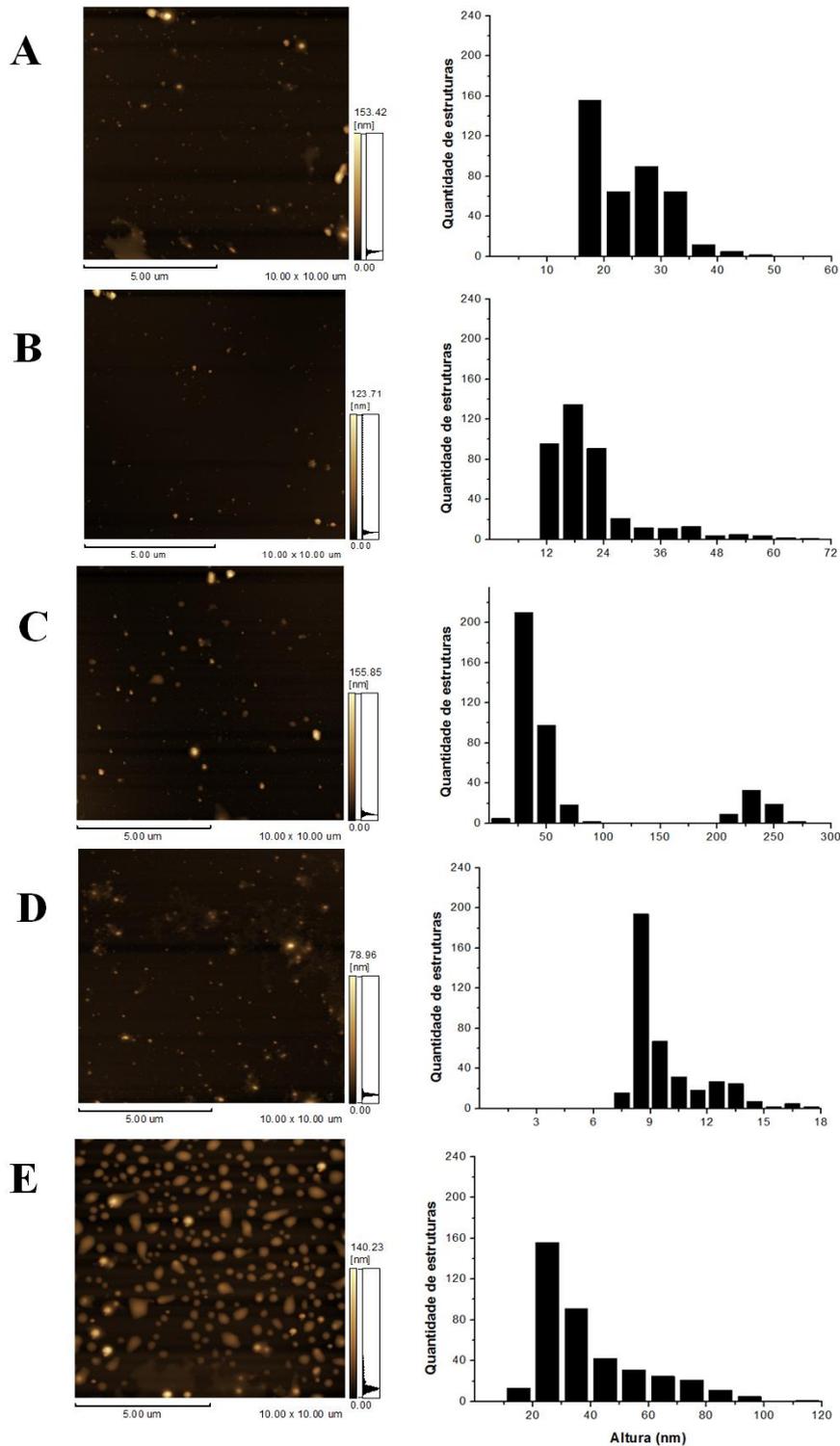
extrato da polpa (Polpa\_AgNPs\_12) e duas referentes ao extrato da semente (Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3). Apesar da amostra AgNPs 12, referente ao extrato da semente (Semente\_AgNPs\_12), também apresentar perfil compatível com o critério adotado para a seleção das AgNPs, esta não foi incluída por falta de material suficiente.

Dentre as amostras selecionadas (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_AgNPs\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3) a maior diferença de potencial Zeta de superfície entre controle e amostra de AgNPs foi referente à solução extrativa da casca a 25 mg/mL que no controle apresentou partículas com potencial Zeta de superfície de aproximadamente -24 mV e AgNPs com potencial Zeta de superfície de aproximadamente -19 mV. As amostras Casca\_AgNPs\_6, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3 tiveram potencial Zeta de superfície entre -22 e -23 mV, sendo que a amostra com extrato da polpa (Polpa\_AgNPs\_12) apresentou o menor potencial Zeta de superfície de (em módulo) dentre as amostras selecionadas, com aproximadamente -16 mV, indicativo de menor estabilidade coloidal dentre as cinco amostras.

As amostras selecionadas foram submetidas à caracterização por microscopia de força atômica (MFA) para determinação da altura e forma das AgNPs. Como podem ser observadas na Figura 5, populações com valores variados de altura foram observadas entre as amostras. A variação de forma e tamanho de NPMs reflete no comprimento de onda em que ocorre a ressonância plasmônica de superfície dessas partículas. A forma esferoidal de AgNPs é característica de ressonância plasmônica de superfície próximo ao comprimento de onda de 430 nm. (GADDAM, 2014; NOGUEZ, 2007). Nesse contexto, a forma esferoidal das AgNPs apresentadas nas imagens por MFA é um dos fatos que reflete o espectro de SPR apresentado por elas (absorção máxima próximo a 420 nm).

A maioria das AgNPs referentes às duas amostras de AgNPs sintetizadas com extrato aquoso da casca do fruto (Figuras 5A e 5B) tiveram altura de aproximadamente 18 nm. Já as AgNPs obtidas por biorredução com extrato da semente apresentaram grande diferença entre

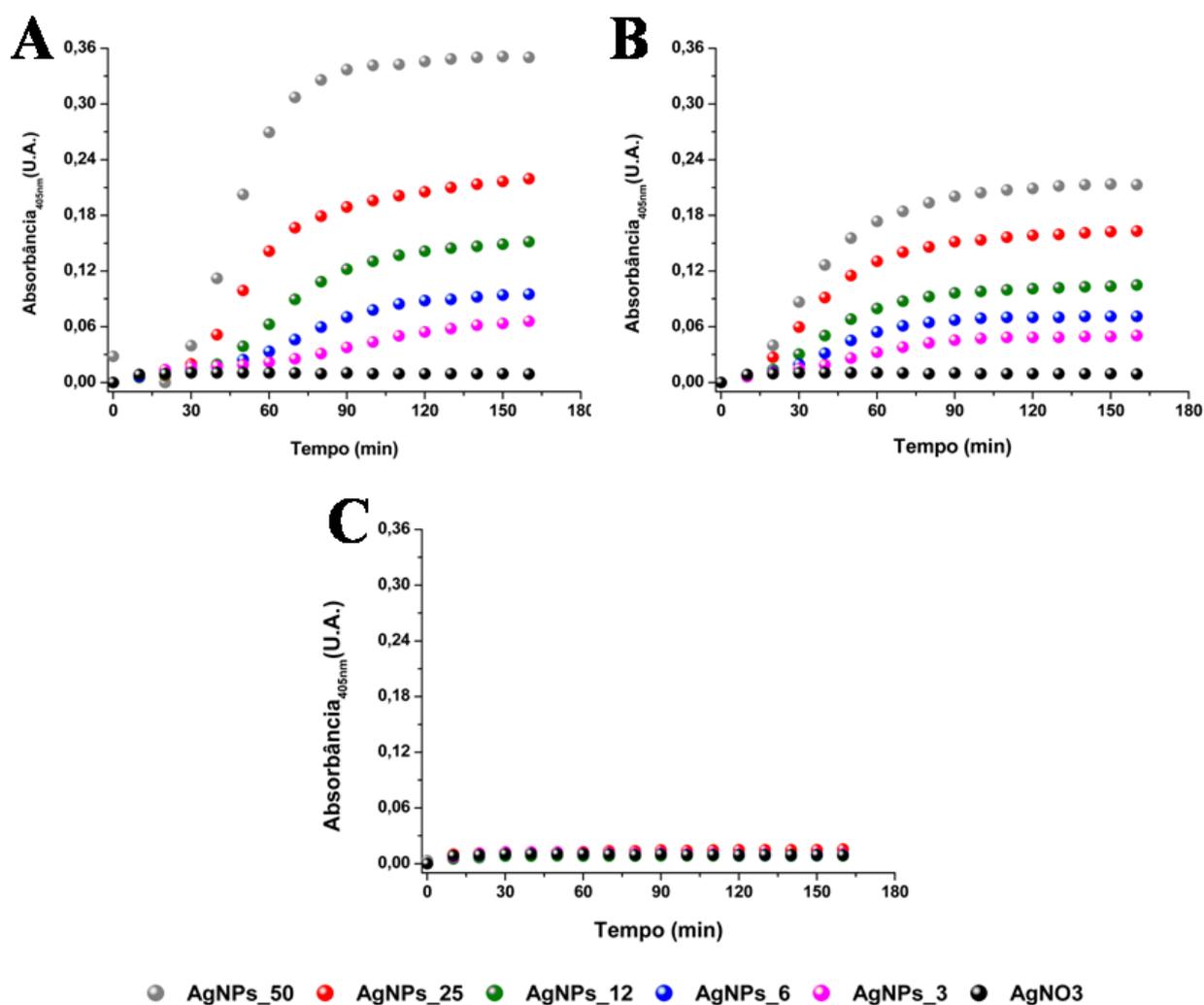
as duas amostras: sendo que as AgNPs obtidas com maior concentração do extrato (Semente\_AgNPs\_6) tinham cerca de 8 nm de altura, enquanto as AgNPs produzidas com a menor concentração do extrato apresentaram aproximadamente 25 nm. As AgNPs obtidas por extrato da polpa do fruto apresentaram partículas de aproximadamente 27 nm de altura como população predominante. A informação quantitativa, estimada pelos histogramas de distribuição de alturas entre as partículas, é confirmada pelas imagens das amostras de AgNPs avaliadas qualitativamente (Figuras 5A-5E).



**Figura 5:** Microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas por extratos aquosos da casca, polpa e semente de mangaba. As imagens topográficas (altura) apresentadas foram adquiridas em modo dinâmico, com resolução de  $512 \times 512$  linhas e frequência de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma das imagens adquiridas totalizadas em aproximadamente 400 AgNPs medidas, das quais o valor da altura, é representado pelos histogramas à direita. A refere-se à amostra Casca\_AgNPs\_25; B à amostra Casca\_AgNPs\_6; C refere-se à amostra Polpa\_AgNPs\_12; D à amostra Semente\_AgNPs\_6; E refere-se à amostra Semente\_AgNPs\_3.

*Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de H. speciosa: frutos maduros colhidos na estação do inverno*

O monitoramento da síntese de AgNPs obtidas a partir de extratos aquosos do fruto maduro (casca, polpa e semente) coletados na estação inverno, foi realizado do mesmo modo que o monitoramento realizado para as AgNPs produzidas com o fruto maduro coletado na estação do verão. Esse monitoramento foi realizado por espectroscopia de absorvância na região do visível no comprimento de 405 nm com duração de aproximadamente duas horas e trinta minutos. As curvas foram plotadas a partir de normalização dos dados referentes ao menor valor de absorvância de cada síntese. Nesse contexto, os gráficos da Figura 6 apresentam indícios de formação de AgNPs para a síntese realizada com extratos da casca e polpa, devido ao aumento gradativo da absorvância em função da ressonância plasmônica de superfície, conforme mostrado anteriormente (BAKER, 2013). Nesse contexto, a síntese referente à Figura 6A apresentou maior potencial para a formação de AgNPs devido ao maior aumento na absorvância mostrada no gráfico. Pode-se observar também que na síntese realizada com extrato da semente não revelou formação evidente de AgNPs.



**Figura 6:** Síntese de AgNPs por extratos aquosos dos frutos maduros de *H. speciosa* coletados no inverno (período de seca) monitorada por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 2,5 horas. A biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e semente do fruto maduro de mangaba, coletados na estação inverno, referem-se às letras A, B e C, respectivamente.

Além da caracterização espectrofotométrica, foram utilizadas as técnicas de DLS e potencial Zeta para caracterizar as partículas obtidas por essas rotas de síntese. Diferentemente das AgNPs obtidas por síntese com extrato dos frutos coletados no verão, as AgNPs das sínteses com o extrato dos frutos coletados no inverno não apresentaram tendência de diminuição dos parâmetros analisados (diâmetro hidrodinâmico, PdI, Potencial Zeta e condutividade elétrica) conforme a redução da concentração do extrato. Esse evento é demonstrado na Tabela 3.

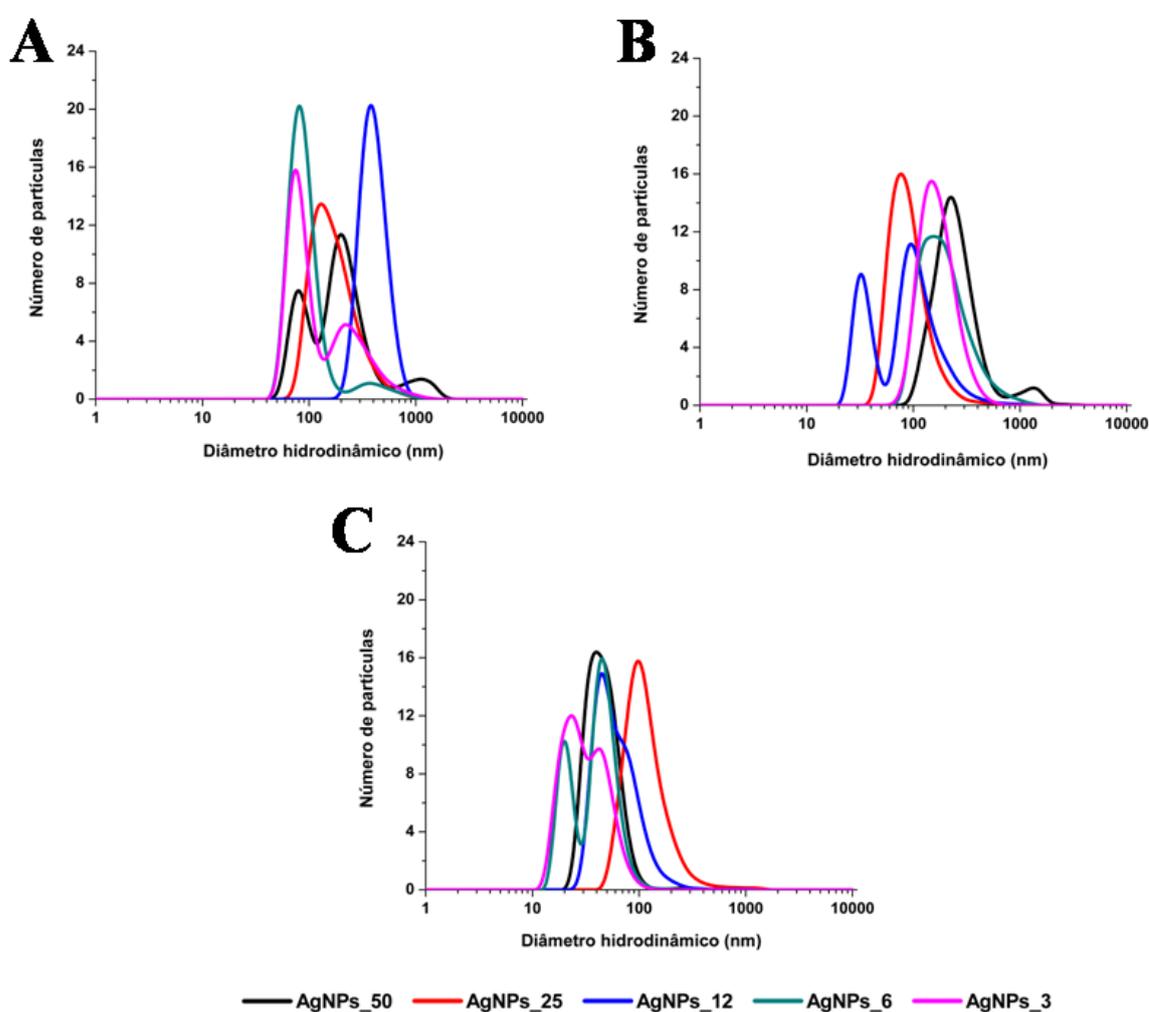
Segundo Hartmann (1996), o perfil dos metabólitos secundários das plantas possui influências das interações entre as plantas e o ambiente. Isso ocorre porque esse metabolismo permite modificações estruturais responsáveis pela diversidade química da planta (HARTMANN, 1996). Assim, a diferença entre as sínteses com o fruto maduro do verão e com o fruto maduro do inverno pode ser influenciada por esse fenômeno, visto que os metabólitos secundários apresentam atuação direta na síntese das MNPs (AKTAR, 2003).

**Tabela 3:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos da casca, polpa e semente do fruto maduro de *H. speciosa* colhidos no inverno. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Casca</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Zeta Potencial (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	689,80 $\pm$ 13,95	0,525 $\pm$ 0,028	-10,8 $\pm$ 0,2	297,00 $\pm$ 3,60
AgNPs_25	345,63 $\pm$ 1,33	0,387 $\pm$ 0,026	-12,8 $\pm$ 0,1	168,00 $\pm$ 1,00
AgNPs_12	656,20 $\pm$ 25,27	0,470 $\pm$ 0,018	-16,2 $\pm$ 0,4	114,33 $\pm$ 1,53
AgNPs_6	599,40 $\pm$ 35,76	0,455 $\pm$ 0,011	-17,1 $\pm$ 0,1	77,50 $\pm$ 1,40
AgNPs_3	444,60 $\pm$ 3,29	0,443 $\pm$ 0,001	-21,1 $\pm$ 0,5	56,70 $\pm$ 0,87
<b>Polpa</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Zeta Potencial (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	1177 $\pm$ 62,36	0,787 $\pm$ 0,058	-9,1 $\pm$ 0,1	215,00 $\pm$ 2,00
AgNPs_25	290,43 $\pm$ 1,14	0,400 $\pm$ 0,011	-10,3 $\pm$ 0,3	130,67 $\pm$ 0,58
AgNPs_12	298,87 $\pm$ 1,95	0,508 $\pm$ 0,023	-26,9 $\pm$ 0,3	62,43 $\pm$ 0,42
AgNPs_6	411,60 $\pm$ 14,81	0,564 $\pm$ 0,073	-7,6 $\pm$ 1,2	63,80 $\pm$ 1,13
AgNPs_3	296,93 $\pm$ 11,17	0,444 $\pm$ 0,013	-12,7 $\pm$ 0,3	49,37 $\pm$ 0,21
<b>Semente</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Zeta Potencial (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	293,97 $\pm$ 6,13	0,464 $\pm$ 0,005	-22,5 $\pm$ 0,2	107,00 $\pm$ 1,00
AgNPs_25	301,53 $\pm$ 8,27	0,522 $\pm$ 0,016	-25,8 $\pm$ 0,4	61,23 $\pm$ 0,21
AgNPs_12	244,83 $\pm$ 7,54	0,502 $\pm$ 0,007	-31,3 $\pm$ 0,5	45,83 $\pm$ 0,71
AgNPs_6	301,77 $\pm$ 9,41	0,932 $\pm$ 0,032	-27,6 $\pm$ 0,6	35,57 $\pm$ 0,11
AgNPs_3	188,00 $\pm$ 3,23	0,826 $\pm$ 0,049	-23,7 $\pm$ 1,4	33,23 $\pm$ 0,84

A técnica de DLS também mostrou a presença de nanopartículas que não foram evidenciadas na caracterização por espectrofotometria. Esse evento pode ser justificado por uma concentração de AgNPs não detectável por essa técnica e que por DLS foi suficiente para ser detectada. Por outro lado, a técnica pode estar apresentando partículas do extrato e não de AgNPs devido aos valores de PdI serem muito altos, indicativo de não uniformidade da suspensão, principalmente nas amostras Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3 (Tabela 3).

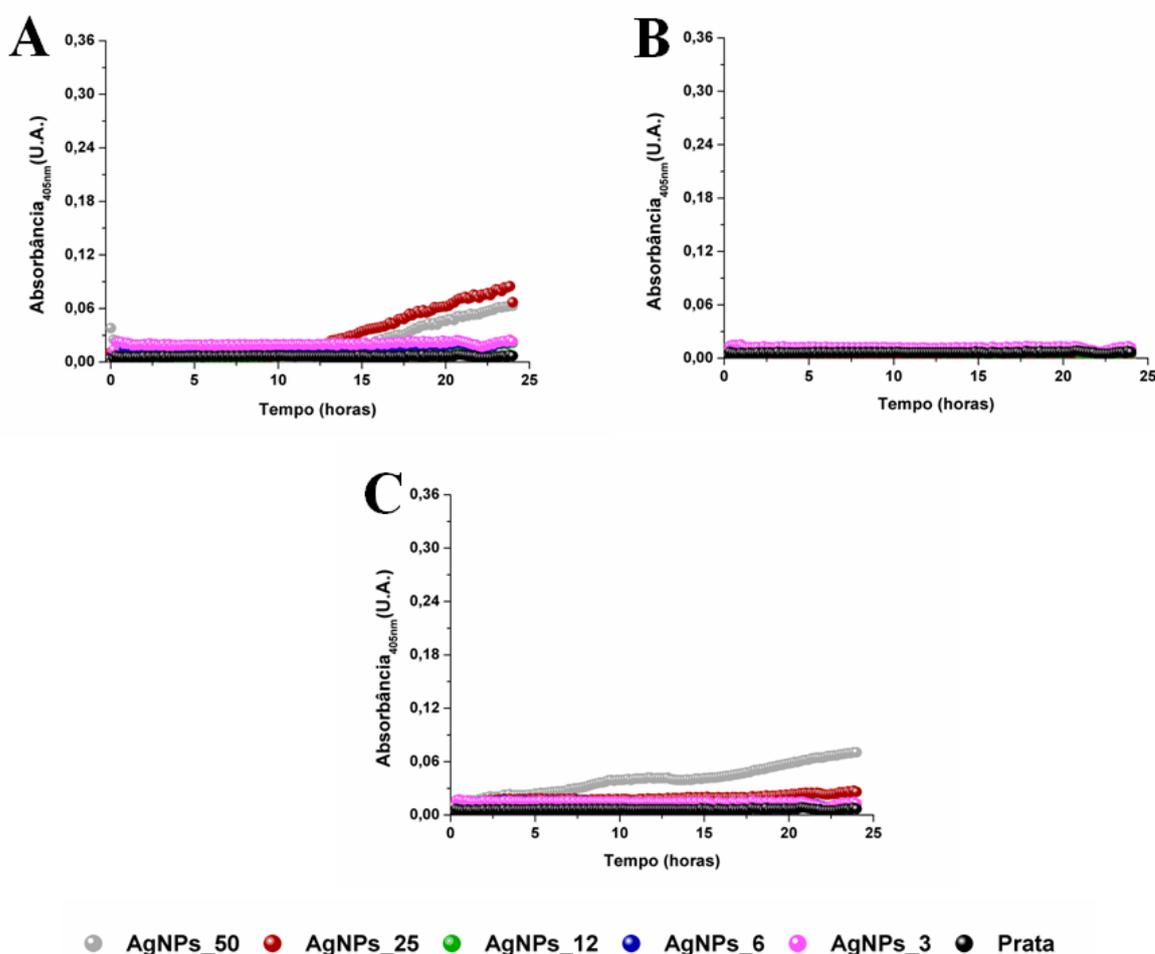
A análise por DLS também mostrou que o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs, referentes ao número de partículas, apresenta grande variação em torno de 200 nm (Figura 7) . Dentre as AgNPs formadas, as obtidas a partir de extrato com semente apresentaram menor tamanho. Observou-se também que as amostras referentes à Casca\_AgNPs\_50, Casca\_AgNPs\_3, Polpa\_AgNPs\_12 e Semente\_AgNPs\_6, apresentaram características típicas de distribuição bimodal no diâmetro hidrodinâmico (Figura 7).



**Figura 7:** Determinação do diâmetro hidrodinâmico por espalhamento de luz dinâmico (DLS), referente ao número (%) de AgNPs sintetizadas por extratos aquosos do fruto maduro de *H. speciosa* coletados na estação inverno. Onde: A refere-se às AgNPs provenientes da síntese por extrato da casca do fruto, B às AgNPs da síntese por extrato da polpa do fruto e C às AgNPs da síntese por extrato da semente.

*Síntese verde de AgNPs por extratos aquosos de H. speciosa: frutos verdes colhidos na estação do inverno*

O monitoramento da síntese de AgNPs obtidas por extrato aquoso dos frutos verdes coletados na estação de inverno também foi realizado por meio de espectrofotometria (Figura 8). Apenas o tempo desse monitoramento foi diferente dos demais já apresentados. Como a formação de AgNPs não foi apresentada nas primeiras horas, a possível síntese foi monitorada por 24 horas. As curvas foram plotadas a partir de normalização dos dados referentes ao menor valor de absorbância de cada síntese. A provável formação de AgNPs foi apresentada apenas na síntese com extrato da casca e da semente. A primeira com a concentração de 50 mg/mL e 25 mg/mL de extrato e a segunda com 50 mg/mL de extrato.



**Figura 8:** Síntese de AgNPs por extratos aquosos do fruto verde de *H. speciosa* monitorada por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm por um período de aproximadamente 24 horas. A biossíntese de AgNPs por extratos da casca, polpa e semente dos frutos verdes colhidos no inverno referem-se às letras A, B e C, respectivamente.

Os parâmetros de caracterização, obtidos por DLS e potencial Zeta (mostrados na Tabela 4), também foram analisados. Apesar da técnica de espectrofotometria não ter apresentado a formação de AgNPs com extrato da polpa, partículas com uma grande variação de tamanho e com potencial Zeta de superfície menores foram apresentadas. Há também a possibilidade de partículas do próprio extrato estarem sendo analisadas ao invés de AgNPs.

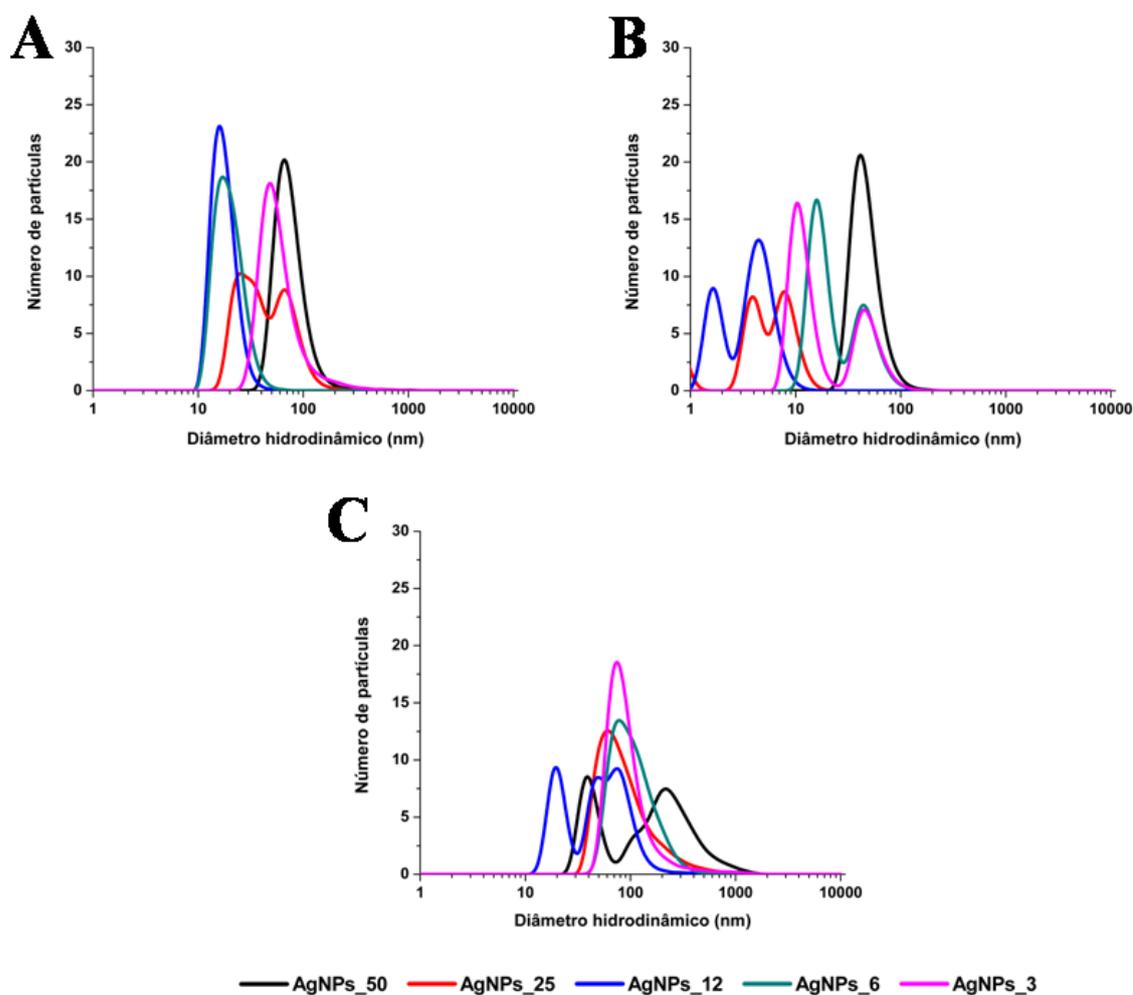
**Tabela 4:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PDI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas por extratos da casca, polpa e semente dos frutos verdes de *H. speciosa* colhidos no inverno. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Casca</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	462,80 $\pm$ 44,21	0,627 $\pm$ 0,098	-20,9 $\pm$ 0,7	134,00 $\pm$ 0,58
AgNPs_25	288,83 $\pm$ 13,27	0,551 $\pm$ 0,059	-23,4 $\pm$ 0,1	74,13 $\pm$ 0,18
AgNPs_12	184,30 $\pm$ 2,08	0,535 $\pm$ 0,013	-26,2 $\pm$ 1,1	52,20 $\pm$ 0,26
AgNPs_6	176,17 $\pm$ 2,63	0,450 $\pm$ 0,016	-26,2 $\pm$ 1,0	41,17 $\pm$ 0,17
AgNPs_3	291,67 $\pm$ 2,94	0,369 $\pm$ 0,019	-28,6 $\pm$ 2,1	35,53 $\pm$ 0,24
<b>Polpa</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	118,70 $\pm$ 1,56	0,496 $\pm$ 0,038	-27,3 $\pm$ 1,9	104,00 $\pm$ 0,58
AgNPs_25	78,67 $\pm$ 2,47	0,602 $\pm$ 0,083	-31,5 $\pm$ 3,6	63,57 $\pm$ 0,97
AgNPs_12	46,15 $\pm$ 0,11	0,560 $\pm$ 0,003	-30,9 $\pm$ 1,4	44,80 $\pm$ 0,17
AgNPs_6	149,97 $\pm$ 2,56	0,442 $\pm$ 0,033	-30,9 $\pm$ 1,1	36,10 $\pm$ 0,06
AgNPs_3	116,77 $\pm$ 4,96	0,404 $\pm$ 0,024	-25,3 $\pm$ 2,5	34,30 $\pm$ 1,29
<b>Semente</b>	<b>Z-Average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Cond. elétrica (<math>\mu</math>S/cm)</b>
AgNPs_50	433,30 $\pm$ 3,08	0,365 $\pm$ 0,005	-22,6 $\pm$ 0,3	91,87 $\pm$ 0,44
AgNPs_25	363,57 $\pm$ 6,82	0,360 $\pm$ 0,021	-24,5 $\pm$ 0,2	56,97 $\pm$ 0,09
AgNPs_12	379,30 $\pm$ 14,78	0,466 $\pm$ 0,024	-29,5 $\pm$ 1,7	39,87 $\pm$ 0,03
AgNPs_6	310,30 $\pm$ 13,79	0,500 $\pm$ 0,020	-26,8 $\pm$ 1,5	35,57 $\pm$ 0,97
AgNPs_3	471,43 $\pm$ 18,87	0,518 $\pm$ 0,042	-20,7 $\pm$ 0,2	31,70 $\pm$ 0,30

Como mencionado anteriormente, existe diferenças entre a proporção dos componentes dos frutos de *H. speciosa* de acordo com o estágio de maturação. Os frutos verdes de *H. speciosa*, por exemplo, apresentam percentual menor de ésteres, alcoois, aldeídos e cetonas e um teor maior de monoterpenos oxigenados como óxido de cis-linalol, óxido de trans-linalol e linalol (SAMPAIO, 2008). Nesse contexto, a grande diferença do perfil entre as sínteses que utilizaram os frutos maduros (colhidos no verão ou no inverno) e

os frutos verdes (colhidos no inverno) pode ser influenciada pela mudança de proporção dos componentes necessários para a formação das AgNPs. Portanto, pode-se sugerir que a quantidade de compostos essenciais para a síntese, encontrados nos extratos dos frutos verdes, não estão em quantidades suficientes para uma formação de AgNPs equivalente aos dos extratos dos frutos maduros.

As AgNPs das amostras com maior concentração de extratos das cascas e sementes mostradas por espectrofotometria e DLS apresentaram grande variação de diâmetro hidrodinâmico entre elas. Características típicas de distribuição bimodal no diâmetro hidrodinâmico da amostra referente à Semente\_AgNPs\_50 exemplifica a variação de tamanho entre as partículas (Figura 9).



**Figura 9:** Determinação do diâmetro hidrodinâmico (número - %) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas por extratos dos frutos verdes de *H. speciosa*. Onde: A refere-se às AgNPs da síntese por extrato das cascas, B às AgNPs da síntese por extrato das polpas e C às AgNPs da síntese por extrato das sementes dos frutos verdes colhidos no inverno.

A variação das amostras das AgNPs obtidas pelas rotas de sínteses baseadas nos frutos sob três condições; com o fruto maduro da estação verão, fruto maduro da estação inverno e fruto verde da estação inverno, pode ter sido influenciada por várias razões. As diferenças de tamanho e potencial Zeta das partículas e homogeneidade da amostra podem ser resultado da concentração do extrato, dos tipos de extratos referentes à parte do fruto, da origem sazonal do fruto e da proporção e natureza dos compostos químicos característico de cada um.

É relatado que o aumento da velocidade da reação favorece a produção de partículas menores. Um dos fatores que favorece esse evento é o aumento da concentração de extrato, agente redutor do íon metálico ( $\text{Ag}^+$ ) (SONG, 2009). Nesse caso, poderá ocorrer a formação de quantidade grande de pequenos núcleos de AgNPs, tendendo à formação de partículas menores e possivelmente ao retardo do crescimento dessas AgNPs (SARKAR, 2007). Contudo, estudos de Sivaraman (2009) mostraram que o aumento da concentração de agente redutor (extrato) pode resultar numa síntese mais lenta. No exemplo daquele estudo, o agente redutor (ácido tânico) era um ácido fraco. Este apresenta poder redutor limitado e pode ser hidrolisado em ácido gálico e glicose. Por sua vez, o ácido gálico forma rapidamente AgNPs, porém não é um bom agente estabilizador, ao contrário da glicose formada. Nesse contexto, o fato das sínteses com os extratos aquosos dos frutos de mangaba terem originado AgNPs de tamanhos variados, indica que a concentração e a natureza dos compostos presentes nos extratos podem ter tido interferência no perfil de redução da  $\text{Ag}^+$  e estabilização das AgNPs.

A medição da condutividade elétrica das AgNPs foi adquirida por meio de condutivímetro microprocessado e pela técnica de potencial Zeta. As amostras de nanopartículas obtidas utilizando extratos da casca, polpa e semente de *H. speciosa*, mantiveram o mesmo perfil de condutividade elétrica com relação às concentrações de extrato das partes de cada fruto. Além disso, nos três extratos de cada fruto (casca, polpa e semente), as AgNPs apresentaram condutividade elétrica um pouco maior que seus respectivos controles. Primeiramente, deve-se levar em consideração que a prata é um metal de transição,

mole e maleável com condutividade elétrica e térmica altas. Apesar de ser menos reativa que o cobre, a prata pode ser dissolvida em ácido nítrico. Ao contrário dos controles que não tem metal em sua formulação (RUSSELL, 1994). Além disso, a menor condutividade elétrica acompanhada pela diminuição gradativa da concentração dos extratos da casca, polpa e semente sugere que a condutividade elétrica também é diretamente proporcional à concentração de extrato utilizada nas formulações, indicando a sua contribuição nessa condutividade maior. Segundo Alshehri (2012), materiais sob a forma de NPMs tendem a apresentar maior energia livre de superfície e maior reatividade química em relação a seu *bulk* homólogo devido à maior proporção de átomos na superfície das AgNPs. Assim, sugere-se que amostras com maior concentração de extrato tenham maior quantidade de componentes capazes de originar AgNPs como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, além de metabólitos secundários como flavonoides, ácido tânico e terpenoides geralmente presentes em tecidos vegetais, sendo que os componentes mais polares estarão presentes no extrato aquoso (AKTAR, 2013). Dessa forma, maior quantidade de AgNPs formadas também resultou em um meio com maior condutividade elétrica.

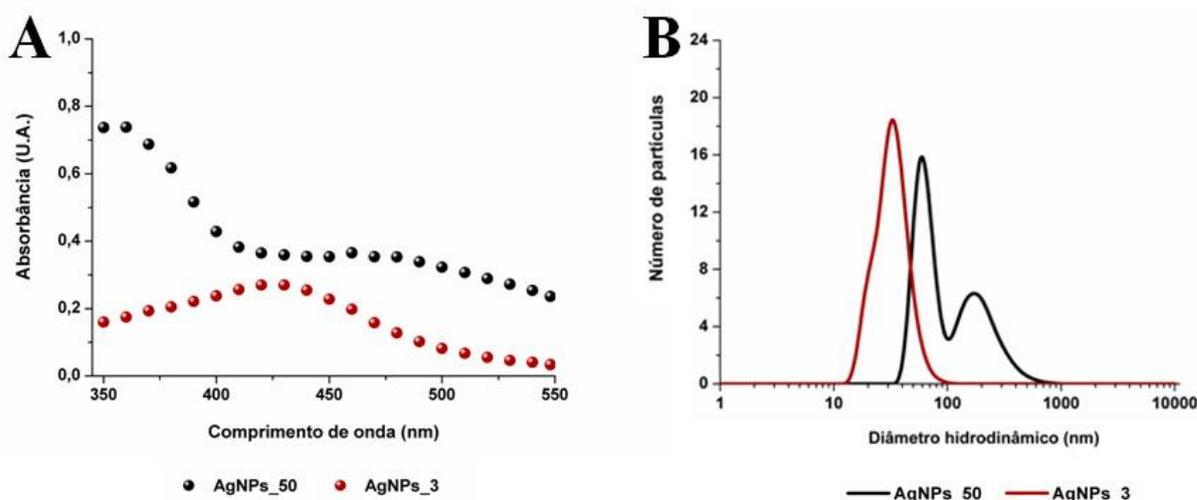
Os estudos de Sampaio e Nogueira (2006) e Kubota (2007) mostraram que ésteres foram os compostos predominantes na composição química do fruto maduro de mangaba, e dentre eles destacam-se: acetato de 3-metil-1-butanila, acetato de 3-metil-3-buten-1-ila e acetato de 3-metil-2-buten-1-ila. Além desses, o triterpeno 3- $\beta$ -O-3,5'- diidroxiicosanoato de lupeóla foi isolado do látex do fruto verde de *H. speciosa*. Contudo, a alfa-amina a beta-amirina e o lupeol, também encontrados no látex da fruta, teriam maior probabilidade de estarem no extrato por terem grupos hidroxilas em sua estrutura molecular, mesmo que ainda seja pouco solúvel em água (SAMPAIO, 2008). Metabólitos secundários da casca como ácido gálico, 2,7-diidroxi-xantona, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, 2,7-dimetoxixantona, clorogenato de metila e ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico podem estar presentes nos extratos da casca por, também, apresentarem hidroxilas em sua estrutura

molecular (GOMES, 2010). É possível, portanto, que alguma ou algumas dessas moléculas, em sinergia, estejam envolvidas com a síntese das AgNPs por extratos da mangaba conforme apresentado no presente estudo.

O potencial Zeta de superfície das AgNPs permitiu sugerir que a nucleação da prata reduzida ( $\text{Ag}^0$ ) ocorreu por biorredução conforme reportado por outros autores (AKHTAR, 2013; MITTAL, 2003). É possível que a  $\text{Ag}^0$  esteja no interior das partículas, enquanto que componentes das soluções extrativas da casca, polpa ou semente de mangaba estejam na periferia das AgNPs. Isso é justificável porque o potencial Zeta das AgNPs apresentou carga negativa para todas as condições dos três tipos de extratos, que mantiveram a negatividade das partículas apresentada no controle.

Como discutido na etapa em que os frutos foram utilizados como fonte de compostos redutores e estabilizantes de sínteses, o extrato das folhas de *H. speciosa* também é constituído por fitocompostos que podem atuar na formação de AgNPs. Além de vários outros compostos anteriormente citados, extratos polares das folhas mostraram que compostos químicos como o inositol L-(+)-bornesitol e o flavonoide rutina podem ser encontrados em folhas de *H. speciosa* (BARROS, 2008). Assim, a possível síntese de AgNPs realizada com folhas de *H. speciosa* nas mesmas condições (temperatura a 25°C e em cinco concentrações de extrato por 24 hs) das sínteses realizadas com os frutos também foi monitorada por espectrofotometria. Contudo, o perfil de formação de AgNPs não foi evidenciado na técnica de espectroscopia, conforme ocorreu em algumas sínteses realizadas anteriormente (com extrato da polpa do fruto verde e do fruto maduro colhidos no inverno).

Desse forma, algumas condições de síntese foram alteradas com o intuito de obter AgNPs em maior concentração e, portanto, mais evidentes. Para isso, a síntese foi submetida à variação de temperatura. Isso porque, segundo Sankar (2007), a temperatura da síntese é um dos fatores que influenciam a velocidade de formação de AgNPs, interferindo diretamente em características dessas partículas. Quando a síntese verde é realizada em temperatura mais alta; os pequenos núcleos, que são formados rapidamente, adquirem maior energia cinética permitindo um aumento de colisão entre eles. Esse evento pode ocasionar aglomeração e, portanto, aumento do tamanho das AgNPs obtidas. Contudo, compostos orgânicos que atuam como estabilizantes de partículas podem impedir essa aglomeração e permitir a obtenção de AgNPs de menor diâmetro. Inicialmente, foi realizada a síntese de AgNPs com folhas de *H. speciosa* à temperatura de 50°C com duração de 24 horas (Figura 10).



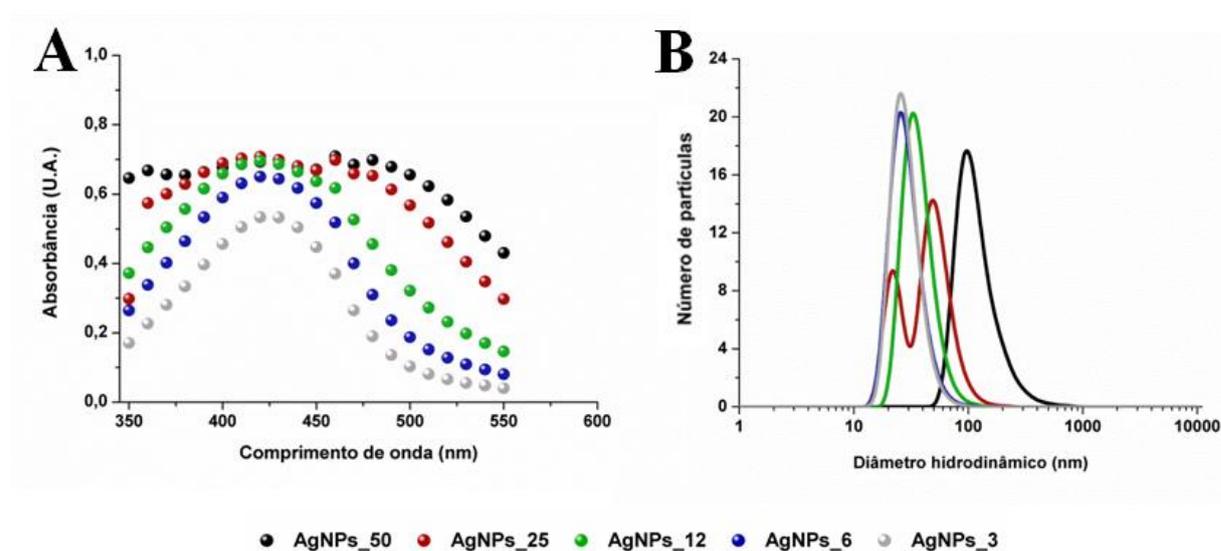
**Figura 10:** Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de *H. speciosa* obtidas a 50°C por 24 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas (amostra diluídas a 1:5).

A curva de absorvância da amostra AgNPs<sub>3</sub> (entre os comprimentos de onda de 350 nm e 550 nm) com um pequeno pico em 420 nm, mostrada na Figura 10A, indica que AgNPs foram formadas nessa condição. O diâmetro hidrodinâmico dessas AgNPs, apresentado na Figura 10B, apresenta um valor de aproximadamente 60 nm de acordo com o número de partículas da amostra. Apesar da amostra AgNPs<sub>50</sub> não ter apresentado pico de absorção na faixa de ressonância plasmônica de AgNPs, tal evento não descarta a presença das mesmas na amostra. A Tabela 5 mostra que as partículas obtidas com maior concentração de extrato (AgNPs<sub>50</sub>) são maiores e possuem potencial Zeta de superfície menor em módulo que as partículas obtidas com a menor concentração de extrato (AgNPs<sub>3</sub>). Assim, as AgNPs<sub>3</sub> são consideradas mais estáveis do que as AgNPs<sub>50</sub>.

**Tabela 5:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PDI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 50°C por extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* coletadas no verão. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Folha	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Cond. elétrica ( $\mu\text{S/cm}$ )
AgNPs_50	840,43 $\pm$ 43,06	0,448 $\pm$ 0,017	-19,0 $\pm$ 0,2	75,30 $\pm$ 0,18
AgNPs_3	230,50 $\pm$ 3,38	0,411 $\pm$ 0,009	-27,4 $\pm$ 2,0	21,03 $\pm$ 0,09

Com o aumento da temperatura, os resultados que indicam a formação de AgNPs, como a curva de absorvância na região que indica a ressonância plasmônica de AgNPs, foi mais expressiva. Com isso, foi realizada síntese de AgNPs com extratos das folhas em várias concentrações do extrato, à temperatura de 75°C, por 24 horas. A Figura 11A mostra as curvas de absorvância de AgNPs obtidas a partir dessa síntese, assim como a distribuição do diâmetro hidrodinâmico dessas partículas em cada amostra por DLS (Figura 11B).



**Figura 11:** Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de *H. speciosa* em 5 concentrações a temperatura de 75°C por 24 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas (amostras diluídas a 1:5).

A primeira técnica mostra a presença de AgNPs nas amostras referentes às cinco concentrações de extrato. Isso porque todas apresentaram maior absorção próxima a 420 nm, ainda que nas maiores concentrações do extrato (50 mg/mL e 25 mg/mL) o pico de absorbância próximo a esse comprimento onda não foi bem definido quando comparado às outras amostras. A concentração do extrato alta pode ter interferido em tal evento, que não descarta a presença das AgNPs por haver evidência de absorção na faixa de ressonância plasmônica de AgNPs.

A segunda técnica (DLS), representada na Figura 11B, mostra uma variação do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs entre as amostras. Há características típicas de distribuição bimodal no diâmetro hidrodinâmico da amostra AgNPs\_25 e distribuição monomodal nas demais amostras. Na Tabela 6, pode-se observar uma tendência de diminuição do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs conforme a redução da concentração de extrato. Contudo, o PDI e o potencial Zeta das AgNPs possui pequena variação entre as amostras. Ao contrário da condutividade elétrica, que conforme as outras AgNPs já apresentadas, diminuiu conforme a diminuição da concentração do extrato. Vale ressaltar que os valores de PDI foram os menores apresentados até o momento, indicando uma maior homogeneidade do tamanho das AgNPs obtidas por essa síntese com folhas quando comparada com as demais rotas de síntese apresentadas com frutos. Segundo Kumar e Yadav (2012), o tamanho e a dispersão de AgNPs podem ser controlados pelos componentes e pelas condições da reação. O aumento da concentração do extrato favoreceu o aumento das partículas e possivelmente a agregação entre elas, que também podem ser influenciadas pela temperatura durante a reação.

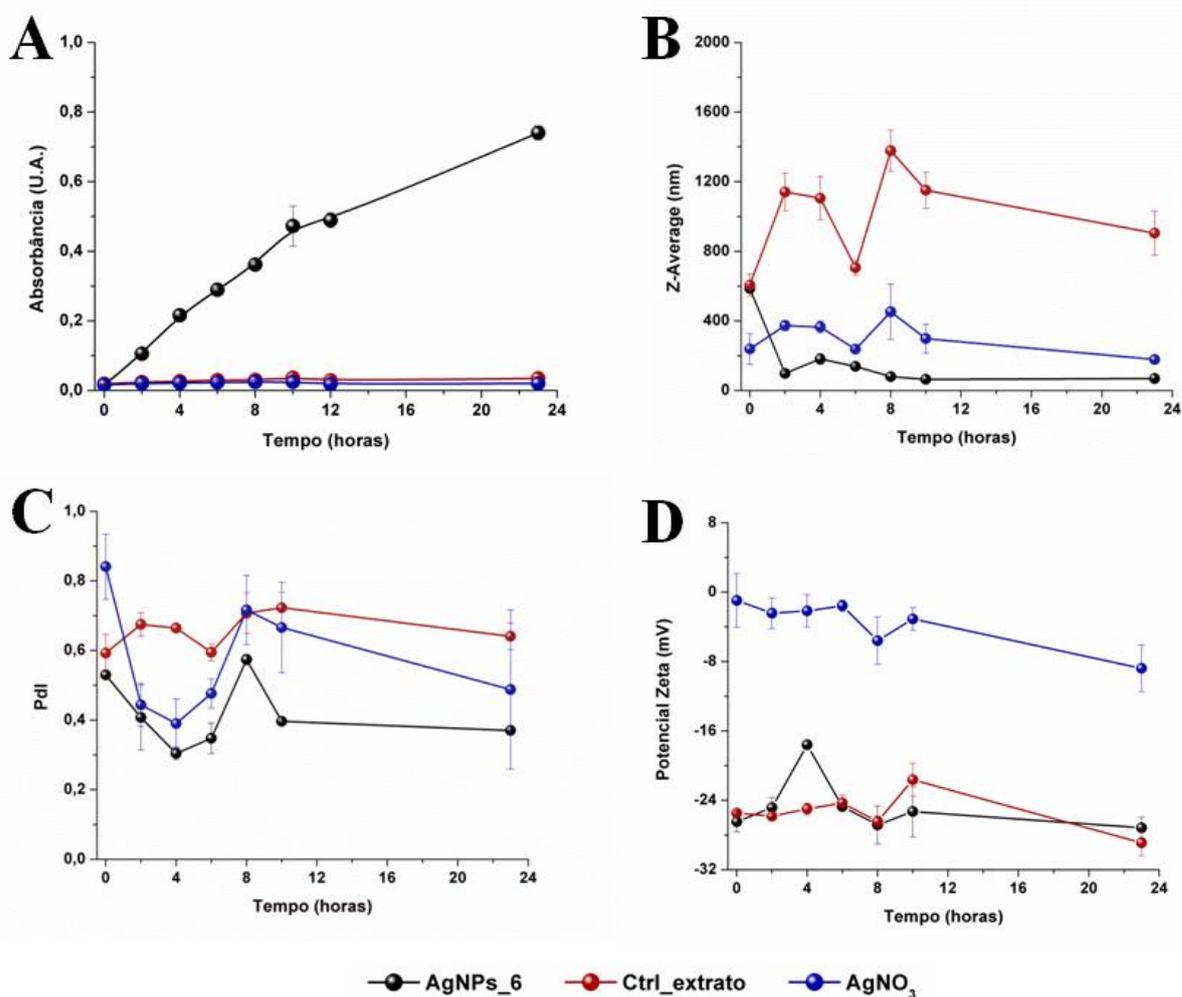
**Tabela 6:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PDI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 75°C por extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* coletadas no verão. Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média.

Folha	<i>Z-Average</i> (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Cond. Elétrica (µS/cm)
AgNPs_50	230,07 ± 1,67	0,241 ± 0,003	-20,5 ± 0,2	82,33 ± 0,18
AgNPs_25	109,47 ± 1,82	0,199 ± 0,007	-23,4 ± 1,3	65,07 ± 0,03
AgNPs_12	78,79 ± 0,78	0,264 ± 0,006	-23,0 ± 1,9	52,57 ± 0,18
AgNPs_6	70,33 ± 0,93	0,267 ± 0,006	-20,7 ± 0,1	44,83 ± 1,34
AgNPs_3	63,14 ± 0,03	0,322 ± 0,021	-20,3 ± 0,1	44,47 ± 1,12

Após a caracterização das AgNPs obtidas da presente síntese, a concentração de 6,25 mg/mL de extrato das folhas foi selecionada para ser utilizada no monitoramento da formação de AgNPs por 24 horas a 75°C. Isso porque as AgNPs\_6 apresentaram um pico de absorvância próximo às amostras de maior concentração de extrato e tiveram o valor de PDI equivalente a 0,27.

Nesse contexto, a síntese de AgNPs com extrato das folhas de *H. speciosa* na concentração de 6,25 mg/mL foi monitorada à temperatura de 75°C com duração de 24 horas. Esse monitoramento foi realizado por espectrofotometria, DLS e potencial Zeta, como mostrado na Figura 12. A formação de AgNPs foi evidente nas primeiras horas de monitoramento da síntese, como é mostrado na Figura 12A. A amostra com AgNPs apresenta um gradativo aumento da absorvância no comprimento de onda de 420 nm, enquanto os controles referentes ao extrato e a prata livre permaneceram inalterados. A Figura 12B, mostra que o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs diminuiu drasticamente após 2 horas de síntese, o qual apresenta leve estabilização após 10 horas. Nesse gráfico, há evidência de nanoestruturação de partículas, pois enquanto a amostra com AgNPs apresenta pequena variação de diâmetro hidrodinâmico em torno de 100 nm (após 2 horas), o controle com extrato apresenta grande variação por volta de 1,2 µm de diâmetro hidrodinâmico representada possivelmente por aglomerados de moléculas do próprio extrato. Esse evento é

confirmado na Figura 12C, onde o PdI das amostras com AgNPs diminui consideravelmente após 4 horas enquanto os controles apresentam PdI em torno de 0,6. Por fim, a Figura 12D mostra desestabilização das AgNPs por volta das 4 horas de monitoramento devido ao aumento do potencial Zeta de superfície (chegando a aproximadamente -17 mV). Todavia, esse evento é seguido de processo contínuo de estabilização até às 24 horas de síntese, em que as AgNPs apresentam potencial Zeta de superfície de aproximadamente -27 mV.

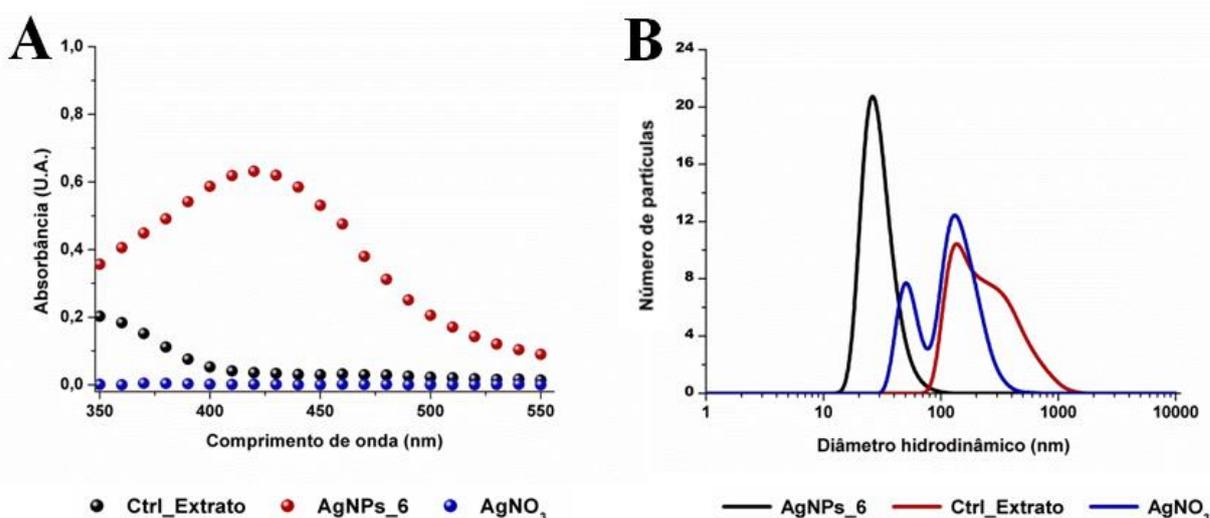


**Figura 12:** Monitoramento da síntese de AgNPs com extrato das folhas de *H. speciosa* a 6,25 mg/mL à temperatura de 75°C por 24 horas. Onde: A refere-se à técnica de espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm (amostra diluída 10×), B e C referem-se à técnica de DLS (Z-average e PdI) e D refere-se à técnica de potencial Zeta de superfície (amostra diluída 5×).

Dessa forma, observou-se que o diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial Zeta de superfície apresentaram variação mínima após 10 horas de síntese. Contudo, não houve estabilização da absorvância após aproximadamente 24 horas. Com isso, o tempo da reação de síntese das AgNPs foi reduzido para 12 horas, as quais foram submetidas a caracterização por DLS, potencial Zeta e MFA, assim como a testes de atividade biológica.

Características das amostras observadas no monitoramento de formação das AgNPs por 24 horas foram confirmadas nas análises das amostras referentes a síntese de 12 horas. A Figura 13A, mostra a ausência de absorção dos controles na faixa de comprimento de onda característica das AgNPs e apresenta curva de absorção das AgNPs que evidencia sua obtenção após síntese de 12 horas.

Além disso, a Figura 13B apresenta uma distribuição monomodal do diâmetro hidrodinâmico da amostra com AgNPs. Na Tabela 7, os controles (extrato e  $\text{AgNO}_3$ ) apresentaram diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta com valores maiores que a amostra com AgNPs, enfatizando o evento de nanoestruturação das AgNPs. Com base no exposto por Sankar (2007), pode-se sugerir que o aumento da temperatura de síntese aumentou a velocidade da reação, formando AgNPs menores que as obtidas anteriormente devido à provável atuação de compostos químicos do extrato na estabilização dessas AgNPs.

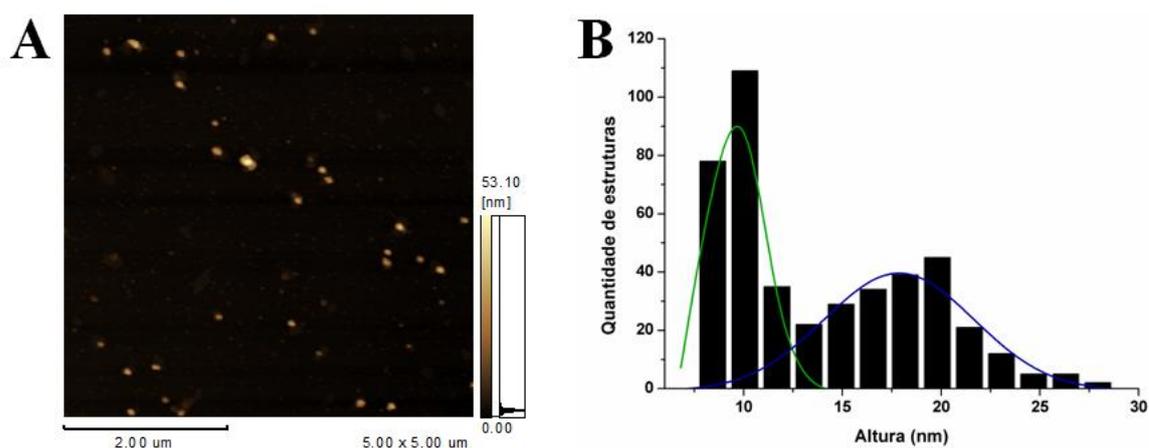


**Figura 13:** Nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde com extratos das folhas de *H. speciosa* a 6,25 mg/mL a 75°C por 12 horas. Onde: A refere-se à curva de absorção das AgNPs e B refere-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs de acordo com o número (%) de partículas da amostra (amostras diluídas a 1:5).

**Tabela 7:** Diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), índice de polidispersividade (PDI), potencial Zeta e condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas a 75°C por extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* coletadas no verão. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Folha	<i>Z-Average</i> (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Cond. elétrica ( $\mu\text{S/cm}$ )
AgNPs_6	81,77 $\pm$ 0,25	0,274 $\pm$ 0,001	-27,7 $\pm$ 0,4	49,53 $\pm$ 0,95
Ctrl_extrato	534,00 $\pm$ 16,13	0,527 $\pm$ 0,036	-24,4 $\pm$ 1,3	19,30 $\pm$ 1,41
AgNO <sub>3</sub>	370,03 $\pm$ 29,28	0,412 $\pm$ 0,019	-3,5 $\pm$ 0,6	28,57 $\pm$ 0,14

As AgNPs\_6 obtidas na presente síntese também foram caracterizadas por MFA (Figura 14). Essa análise mostrou que as AgNPs apresentaram formas esferoidais. Considerando que em estruturas esféricas os valores de altura e diâmetros são equivalentes, a altura das AgNPs foram medidas. A amostra de AgNPs apresentou uma distribuição bimodal das partículas representativas da amostra. Nessa distribuição foram observadas a predominância de AgNPs com altura média de aproximadamente 9,5 nm e outra subpopulação com a maioria das AgNPs com valor médio aproximado de 18 nm de altura.

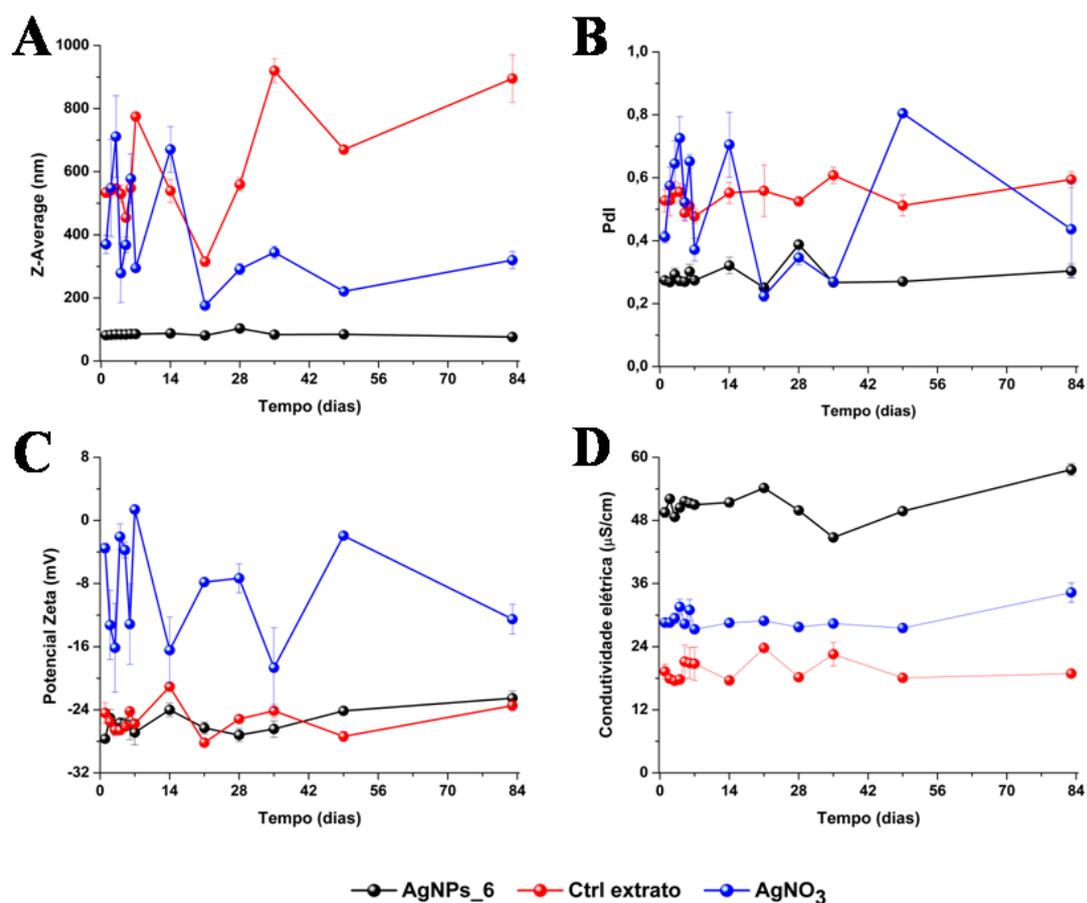


**Figura 14:** Imagem de microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extrato das folhas de *H. speciosa* na concentração de 6,25 mg/mL (Folha\_AgNPs\_6). As imagens topográficas (altura) apresentadas (A) foram adquiridas em modo dinâmico, com resolução de  $512 \times 512$  linhas e frequência de 1 Hz. Cada imagem representativa em 2D refere-se a uma das diversas imagens adquiridas para totalizar um número de aproximadamente 400 AgNPs medidas, das quais o valor da altura, é representado pelo histograma à direita (B).

Como discutido na etapa em que os frutos foram utilizados como fonte de compostos redutores e estabilizantes de sínteses, o extrato das folhas de *H. speciosa* também atuou de maneira semelhante pelos seus constituintes fitoquímicos. De acordo com a carga de superfície das AgNPs, pode-se sugerir que a nucleação da prata reduzida ( $\text{Ag}^0$ ) ocorreu por biorredução conforme reportado por outros autores (AKHTAR, 2013; MITTAL, 2003). Assim, é possível que a  $\text{Ag}^0$  esteja no interior das partículas, enquanto que componentes do extrato da folha estejam na periferia das AgNPs. Isso porque o potencial Zeta das AgNPs apresentou carga negativa em todas as concentrações de extrato e variações de temperatura, mantendo a negatividade apresentado pelos controles apenas com extratos.

As amostras de nanopartículas obtidas utilizando extrato das folhas de *H. speciosa*, também mantiveram o mesmo perfil de condutividade elétrica com relação às concentrações de extrato. Dessa forma, pode-se propor que as amostras com maior concentração de extrato das folhas apresentaram maior quantidade de componentes capazes de originar AgNPs (como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, além de metabólitos secundários) (AKHTAR, 2013) e, portanto, maior quantidade de AgNPs. Dessa forma, maior número de AgNPs formadas também resultou em um meio com maior condutividade elétrica.

As AgNPs\_6 obtidas por síntese com duração de 12 horas também foram submetidas a teste de estabilidade com duração de 3 meses à temperatura de 4°C. O monitoramento da estabilidade foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm. Nessa técnica não houve diminuição da absorbância das amostras com AgNPs (diluídas 1:5) durante o período monitorado, sugerindo a permanência de concentração de AgNPs produzidas.



**Figura 15:** Teste de estabilidade coloidal de AgNPs\_6 obtidas por síntese verde com extrato das folhas de *H. speciosa* a 75°C por 12 horas. O monitoramento foi realizado durante 3 meses no qual foi avaliada o diâmetro hidrodinâmico (A), o PdI (B), o potencial Zeta (C) e a condutividade elétrica (D) das AgNPs.

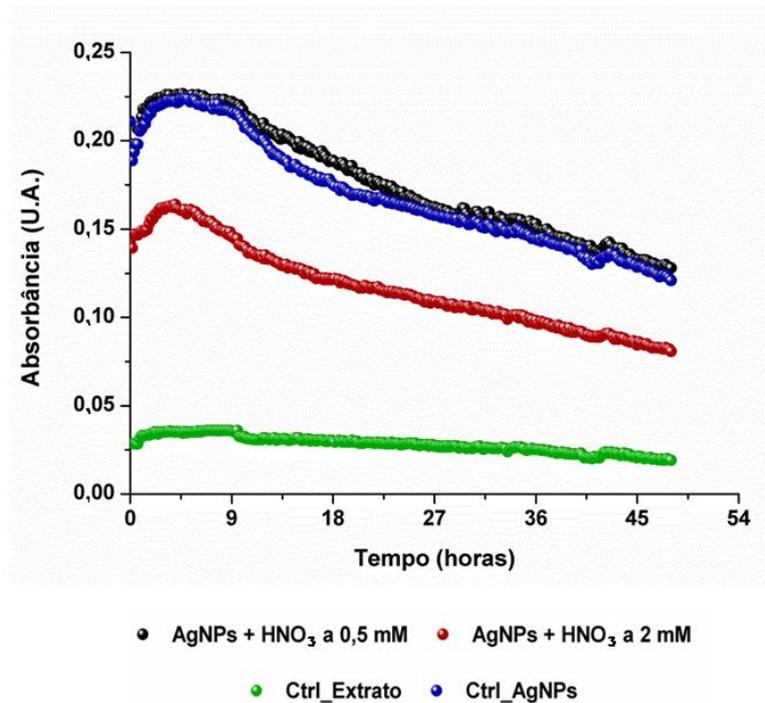
Como mostra a Figura 15, outros parâmetros foram avaliados, são eles: diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*), PdI, potencial Zeta e condutividade elétrica. Dentre estes, o primeiro e o segundo parâmetro apresentaram estabilização satisfatória apesar de pequena variação do PdI por volta do 28º dia. Pode-se observar também que as partículas do extrato apresentam variação alta do diâmetro hidrodinâmico e PdI em torno de 0,5 em todo período de monitoramento, confirmando a estabilização das AgNPs frente ao controle com apenas o extrato. O potencial Zeta de superfície das AgNPs apresentou variação mínima nos primeiros 30 dias após a síntese e uma discreta diminuição em módulo após esse período obtendo

valores aproximadamente entre -28 mV e -23 mV. Quanto à condutividade elétrica, as amostras de AgNPs continuaram com o perfil de maior condutividade que os controles (extrato e prata livre) apresentando uma leve diminuição no 35º dia que foi suprimida logo após esse período com o aumento gradativo da mesma até aproximadamente 55  $\mu\text{S}/\text{cm}$  no último dia de monitoramento.

Estudo de estabilidade de AgNPs em água mostra que essas partículas permaneceram estáveis durante o período de 5 dias a temperatura ambiente. As AgNPs em suspensão na água não apresentaram alterações significativas durante o monitoramento. Nesse período; o espectro de absorvância em visível, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial Zeta das AgNPs não apresentaram grande variação, indicando a estabilidade das AgNPs em água como reportado anteriormente para partículas produzidas com outros extratos (BALACHANDRAN, 2013).

Além do teste de estabilidade, foi realizado um teste de possível dissolução das AgNPs referentes à mesma síntese. Partindo da premissa que a prata pode ser dissolvida em ácido nítrico (RUSSEL, 2014), realizou-se a tentativa de dissolver as AgNPs. Esse teste foi monitorado por espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm.

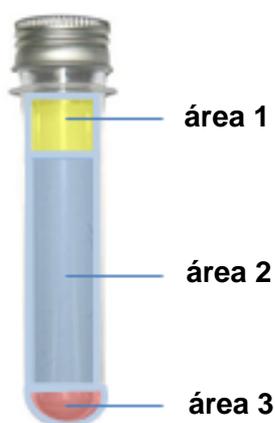
Conforme mostra o gráfico da Figura 16, as duas concentrações de ácido nítrico utilizadas (0,5 e 2 mM) não promoveram dissolução. O decaimento do sinal de ressonância plasmônica de superfície das AgNPs é muito pequeno e está presente tanto nas amostras com AgNPs quanto no controle referente a essas amostras. Sugere-se que esse evento tenha ocorrido devido a aderência das AgNPs à superfície de poliestireno (material da microplaca utilizada para o ensaio), visto que foi observada a mudança de cor dos poços que continham AgNPs.



**Figura 16:** Teste de dissolução de AgNPs<sub>6</sub> obtidas por síntese verde com extrato da folha de *H. speciosa* a 75°C por 12 horas com ácido nítrico. O teste foi monitorado no período de 48 horas por meio de espectroscopia de absorvância no comprimento de onda de 405 nm.

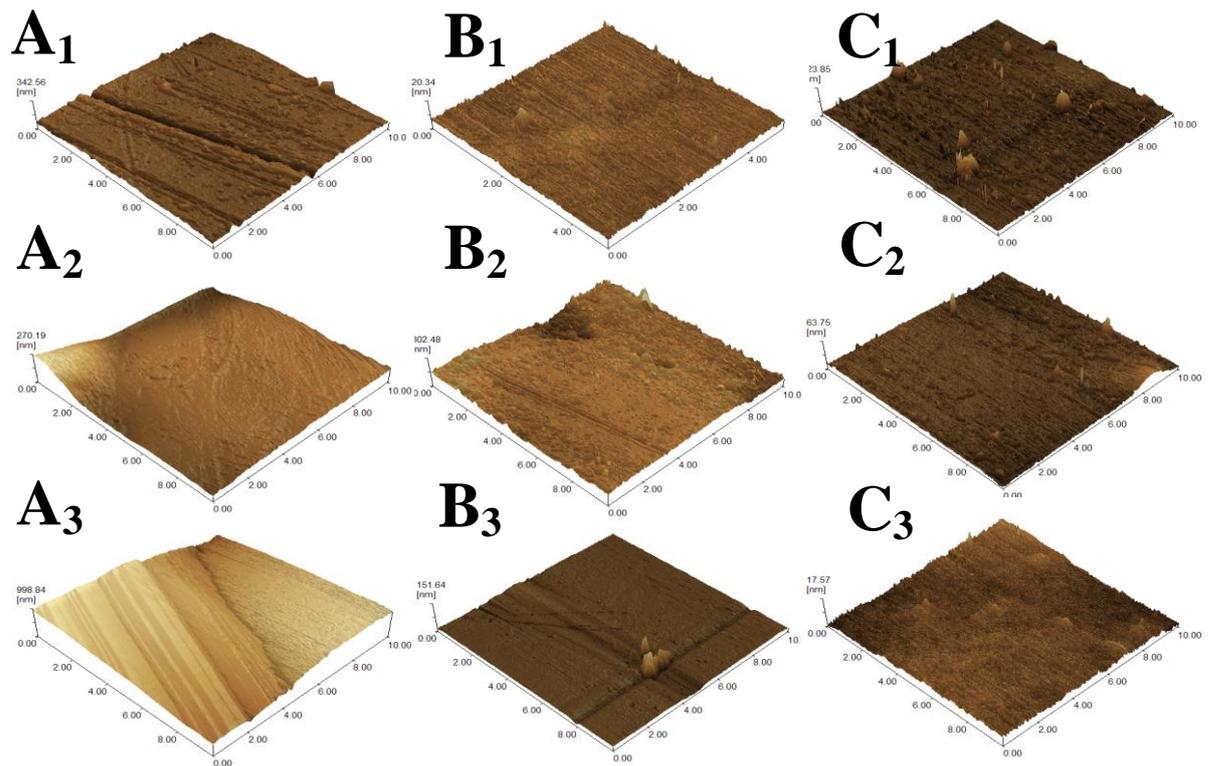
*Caracterização da superfície interna de preformas de poli(tereftalato de etileno) e imobilização de AgNPs em superfície polimérica*

A caracterização da superfície interna de preformas PET permitiu a seleção da superfície mais adequada para possível imobilização das AgNPs nesse polímero. Essa caracterização foi realizada com três tipos diferentes do poli(tereftalato de etileno): incolor, de coloração verde e de coloração preta, em três áreas distintas da preforma conforme é indicado na Figura 17.



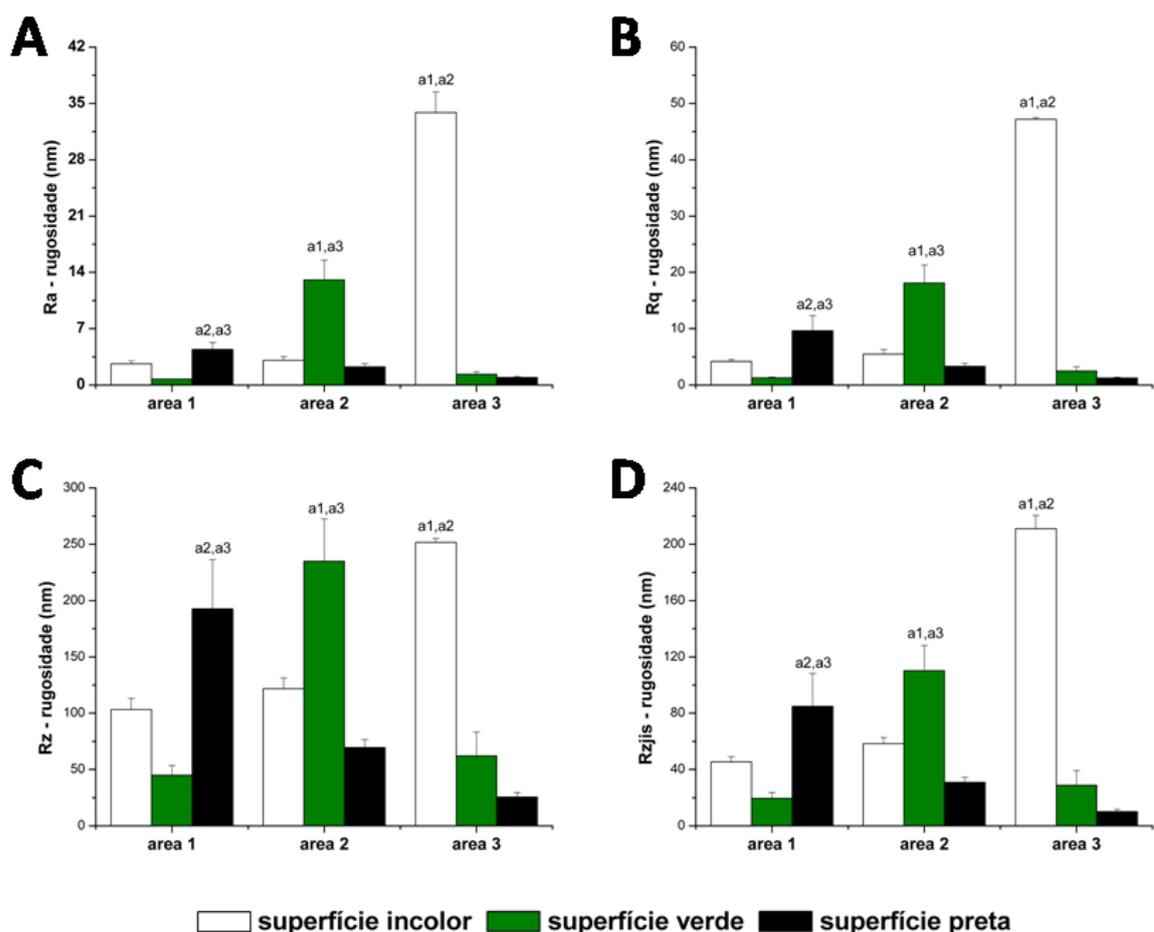
**Figura 17:** Desenho esquemático de preforma PET com as 3 áreas de análises

A caracterização topográfica qualitativa é demonstrada na Figura 18 e mostra que para um mesmo tipo de tubo as áreas (1, 2 e 3) apresentam diferenças topográficas na superfície entre si. Em geral, a comparação de uma mesma área em tubos de cores diferentes mostrou homogeneidade na superfície interna das preformas.



**Figura 18:** Imagens topográficas (3D - Mix) da superfície interna de preformas PET obtidas por microscopia de força atômica em modo contato. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> referem-se às amostras de tubos incolores, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> referem-se às amostras de tubos verdes e C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> referem-se às amostras de tubos pretos das áreas 1, 2 e 3 respectivamente.

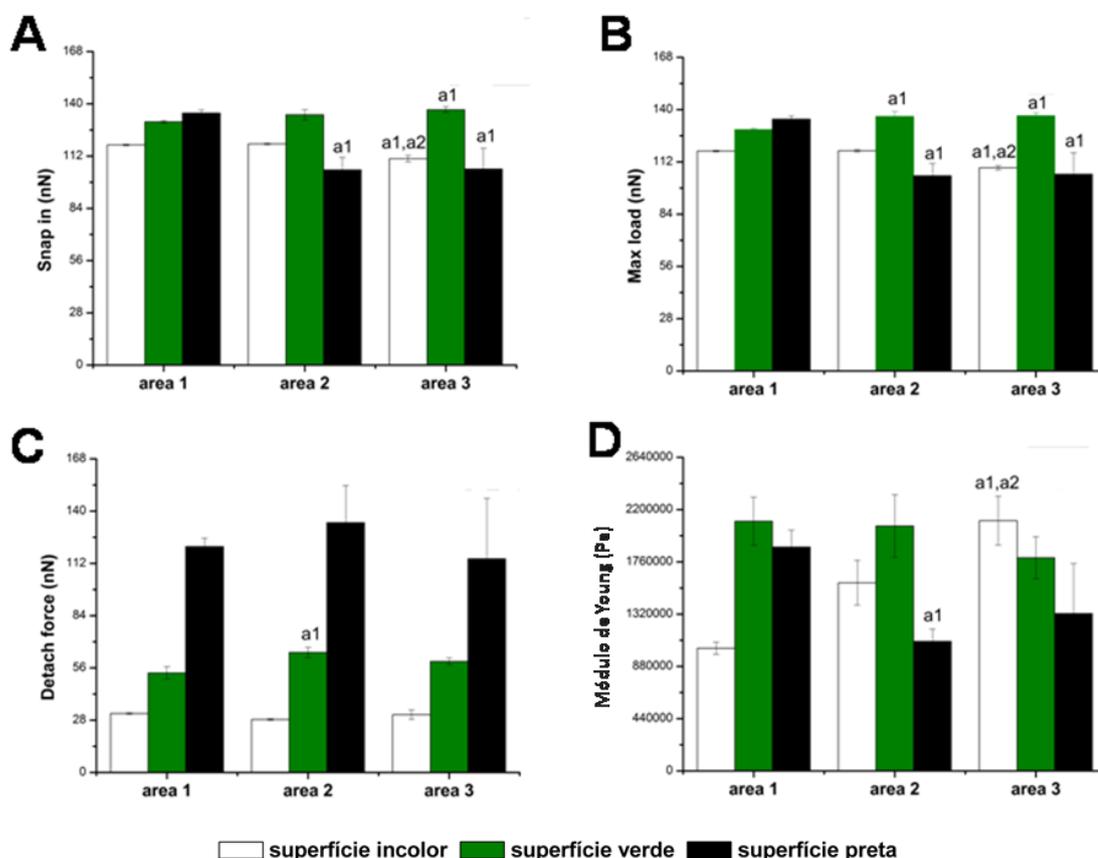
Com relação à nanorugosidade, quatro parâmetros foram utilizados: rugosidade média (Ra), raiz quadrática da rugosidade média (Rq), distância média entre os picos e os vales (Rz), distância média entre a linha média e os 10 picos mais altos (Rzjis). Com base nesses parâmetros pode-se observar que a área 2 do tubo verde e a área 3 do tubo incolor tem valores maiores para todos os parâmetros. Essas áreas são aproximadamente 5 vezes mais rugosas do que a área 1 quando se compara as três áreas de um mesmo tubo (Figura 19).



**Figura 19:** Nanorrugosidade da superfície interna de preformas PET obtida por meio de microscopia de força atômica em relação aos parâmetros Ra, Rq, Rz e Rzjis (A, B, C e D respectivamente). Os histogramas mostram que há diferença significativa entre as áreas do mesmo tipo de tubo. As representações a1, a2 e a3 indicam a existência de diferença significativa comparadas às áreas 1, 2 e 3 do mesmo tubo respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Para a obtenção das propriedades mecânicas por meio da espectroscopia de força (Figura 20), quatro parâmetros foram selecionados: *snap in force*, *max load force*, *detach force* e módulo de Young. Esses parâmetros descrevem padrões de atração entre a ponta e a amostra, assim como dureza, adesão e elasticidade da amostra. Nesse contexto, a área 3 de todos os tubos apresentou diferença na dureza e elasticidade quando comparada com a área 1 do tubo de mesma cor. Da mesma forma que comparando uma mesma área entre os tubos de cores distintas foi observado diferença significativa nos parâmetros de dureza, elasticidade e

adesão entre elas, principalmente entre as áreas 2, confirmando a heterogeneidade entre diferentes regiões de um mesmo tubo PET.



**Figura 20:** Parâmetros de espectroscopia de força de superfície interna de preformas PET. A, B, C e D referem-se a *Snap in*, *Max load*, *Detach force* e módulo de Young (*Young modulus*), respectivamente. Esses parâmetros mostram que há diferença significativa entre amostras das áreas do mesmo tubo. Representação a1 e a2 indicaram diferenças significativas quando comparado as áreas 1 e 2 do mesmo tubo, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Como pode ser observado na Figura 18, que expressa propriedades mecânicas das superfícies dos tubos PET, o tubo incolor apresenta valores menores do que os demais tubos para os parâmetros *snap in*, *max load* e *detach force*, além de também valores menores para o módulo de *Young* de todas as áreas, exceto a área 3. Apesar disto, vale lembrar que a superfície interna da área 3 da preforma incolor também apresentou valores significativamente maiores para todos os parâmetros de nanorrugosidade. Apesar do valor

baixo também no parâmetro de adesão da preforma incolor, pode-se considerar esta amostra válida para a imobilização de AgNPs em preformas PET, em função de todas as demais características observadas. Nesse contexto, a área 3 foi a área de escolha para as análises que comprovem a imobilização das AgNPs nessa superfície polimérica.

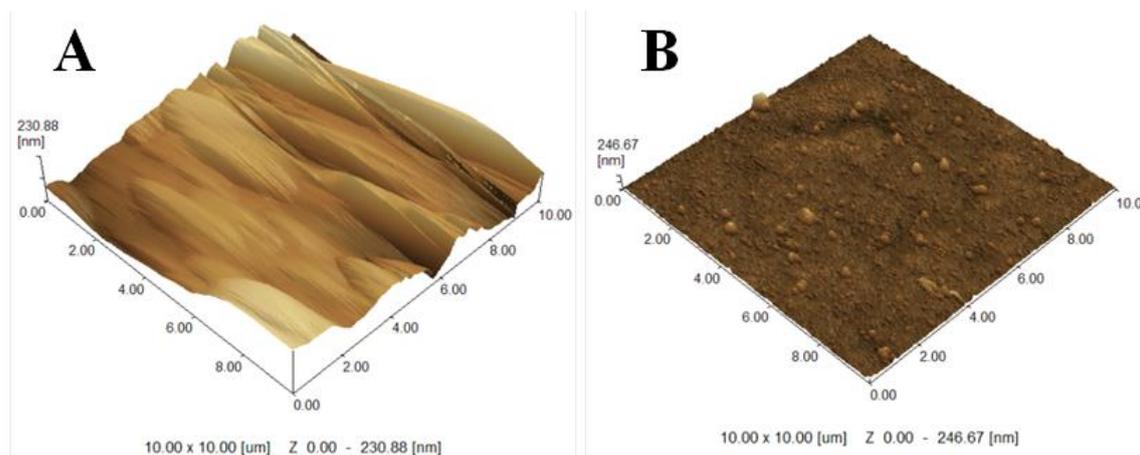
A imobilização das AgNPs foram realizadas por adsorção durante a síntese de AgNPs com extrato da folha de *H. speciosa*. As condições de síntese incluem a concentração de 6,25 mg/mL do extrato aquoso, a temperatura de 75°C e duração de 24 horas. Nesse processo, interações eletrostáticas entre íons presentes na superfície de AgNPs e íons de moléculas de tereftalato de etileno podem ter sido responsáveis pela aderência de AgNPs na superfície polimérica de PET.

Além da imobilização de AgNPs em superfície interna de preformas PET a imobilização de AgNPs em superfície interna de microtubos de polipropileno de 1,5 mL também foi realizada com o mesmo princípio e método. Segundo Barbosa e Silva (2013), não há diferença significativa ao longo da superfície interna do tubo de acordo com os parâmetros de Ra e Rq. Contudo, conforme os parâmetros de Rz e Rzjis, os microtubos apresentam superfície irregular em nanoescala.

A área 3 da superfície interna de preformas após a imobilização de AgNPs foi caracterizada qualitativamente e quantitativamente quanto aos parâmetros de nanorugosidade. Os valores de rugosidade média (Ra), raiz quadrática da rugosidade média (Rq), distância média entre os picos e os vales (Rz) e distância média entre a linha média e os 10 picos mais altos (Rzjis) foram analisados com o objetivo de avaliar as diferenças da superfície polimérica antes e após a imobilização das AgNPs.

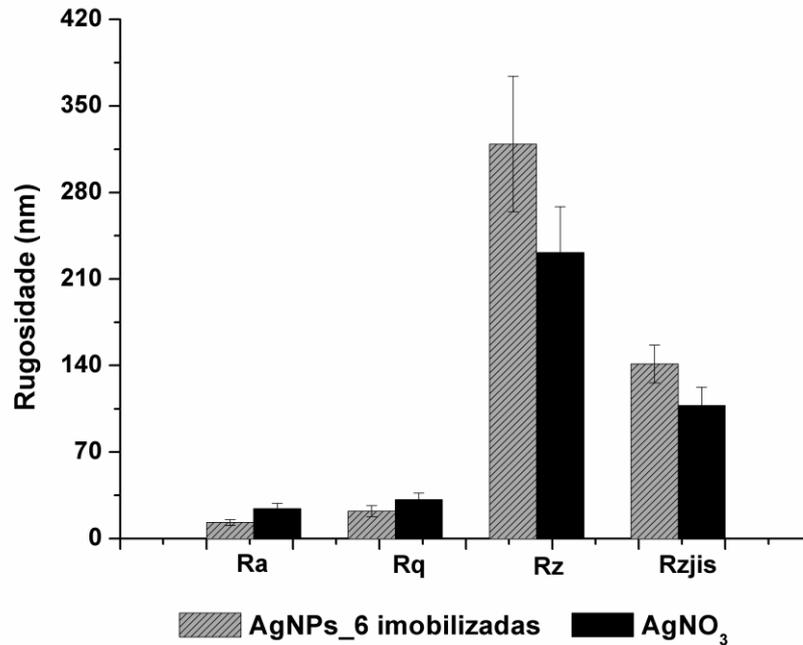
As imagens topográficas referentes ao controle com AgNO<sub>3</sub> (Figura 21A) e às AgNP\_6 imobilizadas (Figura 21B) mostram que há diferença entre as duas amostras. A Figura 21B apresenta estruturas em sua superfície, sugerindo a imobilização das AgNPs\_6. Quando ambas são comparadas com a superfície interna da preforma com nenhum tratamento

(Figura 18A<sub>3</sub>) a imagem referente ao controle com AgNO<sub>3</sub> (Figura 21A) apresenta maior semelhança que a imagem correspondente às AgNPs<sub>6</sub> imobilizadas (Figura 21B).



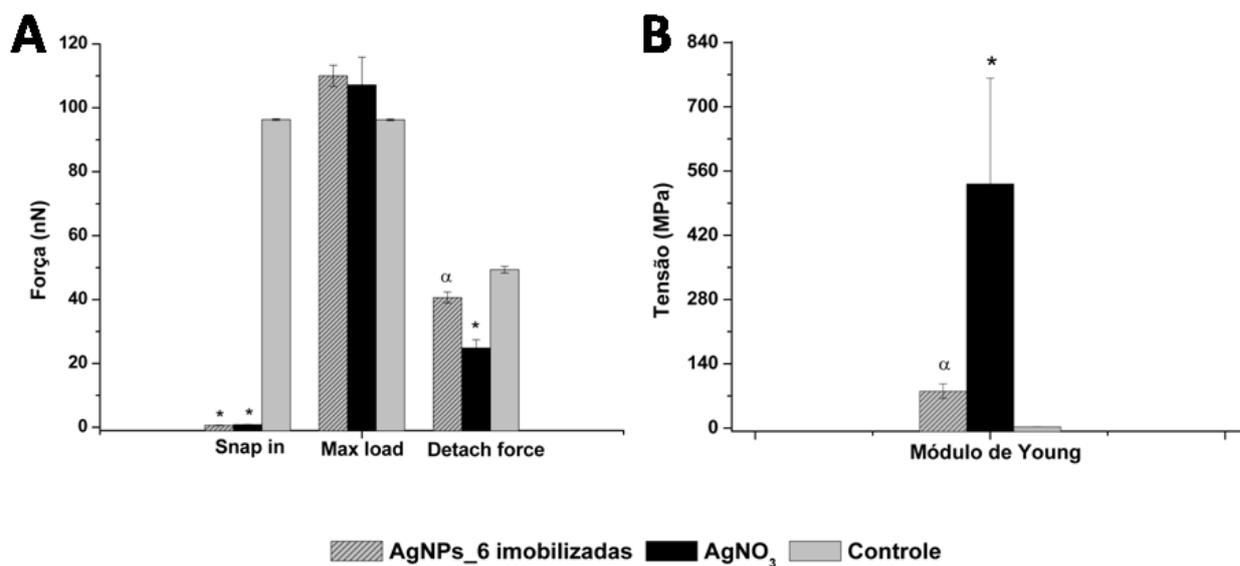
**Figura 21:** Imagens topográficas (3D - Mix) da superfície interna de preformas PET obtidas por MFA em modo contato. A refere-se à área 3 do tubo incolor correspondente ao controle com AgNO<sub>3</sub> e B refere-se à área 3 do tubo incolor correspondente a superfície imobilizada com AgNPs.

Entretanto, nas análises quantitativas de nanorrugosidade (Figura 22), os parâmetros abordados não mostraram diferença estatística significativa entre as amostras referentes ao controle AgNO<sub>3</sub> (Figura 21A) e referente às AgNPs<sub>6</sub> imobilizadas (Figura 21B)



**Figura 22:** Nanorrugosidade da superfície interna de preformas PET em relação aos parâmetros Ra, Rq, Rz e Rzjis após tratamento com AgNPs e AgNO<sub>3</sub>. O histograma mostra que não há diferença significativa entre a área referente ao controle com AgNO<sub>3</sub> e a área referente às AgNPs<sub>6</sub> imobilizadas ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

As análises quantitativas referentes às propriedades mecânicas da superfície de poli (tereftalato de etileno) após tratamento são representadas na Figura 23. As análises por espectroscopia de força mostraram que as forças atrativas entre a ponta e a superfície da amostra (*Snap in*) são semelhantes para a superfície com AgNPs<sub>6</sub> imobilizadas e a superfície com AgNO<sub>3</sub>. Além disso, ambas apresentaram grande diferença com relação ao controle (preforma PET sem tratamento), o qual apresentou forças atrativas de maior intensidade. A superfície da preforma com as AgNPs mostrou semelhança com a superfície da preforma sem tratamento tanto para o parâmetro *Detach force* quanto para o Módulo de Young, mostrando que as características adesivas e elásticas são semelhantes entre as duas superfícies. Por fim, as análises mostraram que a dureza do material não apresentou alteração após o tratamento, seja com AgNPs ou AgNO<sub>3</sub>.



**Figura 23:** Espectroscopia de força de superfície interna de preformas PET após tratamento com AgNPs e AgNO<sub>3</sub>. A refere-se aos parâmetros *Snap in*, *Max load* e *Detach force* e B refere-se ao módulo de *Young* (*Young modulus*). Onde: \* indica diferença estatística significativa em relação ao controle e  $\alpha$  indica diferença estatística significativa com relação ao controle com prata livre ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Há na literatura, vários relatos sobre os possíveis mecanismos de ação das AgNPs em sistemas biológicos. Asharani (2009) e colaboradores avaliaram a toxicidade de AgNPs utilizando fibroblastos de pulmão humano e células de glioblastoma humano. Nesse estudo, a presença de AgNPs no núcleo e na mitocôndria indicou a ruptura da cadeia respiratória mitocondrial originando espécies reativas de oxigênio (ROS) e bloqueio da síntese de ATP causando dano ao DNA. Outros estudos, como o de Huh e Kwon (2011), abordam a ação antimicrobiana de nanomateriais à base de prata apesar de admitir que ainda não é claramente conhecido o mecanismo de ação. Sugere-se que quando as AgNPs entram em contato com microrganismos, existem, entre outros danos; produção de ROS, ruptura da membrana celular, dano mitocondrial e dano ao DNA.

Os testes de atividade biológica das AgNPs obtidas por síntese verde com extratos dos frutos maduros de *H. speciosa* coletados no verão abordam os ensaios de susceptibilidade de fungos e viabilidade celular de microrganismos e fibroblastos. Vale ressaltar que para a obtenção do percentual de viabilidade celular, os valores do controle branco (água) e da prata livre (solução de AgNO<sub>3</sub>) foram considerados.

No teste de susceptibilidade com o fungo *Fusarium oxisporum*, houve o crescimento do fungo em todos os controles. As amostras selecionadas (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_AgNPs\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3) inibiram o crescimento do fungo em concentração de 4 µM para as amostras contendo AgNPs e para o controle com prata livre na mesma concentração. O dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* foi submetido ao mesmo teste o qual apresentou inibição do crescimento a 16 µM para as amostras Casca\_AgNPs\_25 e Polpa\_AgNPs\_12 e a 8 µM para as outras amostras (Casca\_AgNPs\_6, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_3), além da prata livre. Um estudo de Kim (2012) também mostrou

que a maioria dos fungos patogênicos para plantas testados em seu trabalho tiveram seu crescimento inibido pela presença de AgNPs.

No teste de viabilidade celular, como pode ser observado na Tabela 8, a levedura *Candida krusei* apresentou viabilidade celular inalterada ou até mesmo aumentada em ambas as concentrações de AgNPs, assim como nos controles, sendo que para todas as condições de extrato apresentadas (Casca\_25, Casca\_6, Polpa\_12, Semente\_6 e Semente\_3) a levedura teve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de viabilidade em amostras contendo AgNPs quando comparadas ao seu respectivo controle. Esse evento pode ser justificado pela presença de nitrato proveniente do  $\text{AgNO}_3$  utilizado para a síntese das AgNPs. Segundo HacsKaylo (1954), os fungos possuem habilidades diferentes em utilizar compostos de nitrogênio para o seu crescimento e pode ser que o contraíon nitrato presente nas AgNPs tenha apresentado um efeito positivo sobre o crescimento de *C. krusei* no presente estudo. Outra hipótese é a de que algum componente do extrato ou as nanopartículas possa ter conduzido a algum tipo de resultado falso positivo por meio desse ensaio utilizado.

**Tabela 8:** Percentual de viabilidade celular de *Candida krusei* por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs e seus respectivos controles (Ctrl) dos extratos de 8  $\mu\text{M}$  e 4  $\mu\text{M}$ . Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

	Concentração a 8 $\mu\text{M}$		Concentração a 4 $\mu\text{M}$	
	Ctrl extrato (%)	AgNPs (%)	Ctrl extrato (%)	AgNPs (%)
Casca_25	122,34 $\pm$ 3,60	159,68 $\pm$ 1,09	125,82 $\pm$ 2,95	158,13 $\pm$ 4,67
Casca_6	113,98 $\pm$ 3,26	134,19 $\pm$ 9,14	112,24 $\pm$ 0,88	125,29 $\pm$ 5,46
Polpa_12	107,93 $\pm$ 3,63	125,49 $\pm$ 2,32	107,25 $\pm$ 0,86	131,05 $\pm$ 0,95
Semente_6	118,67 $\pm$ 2,02	138,20 $\pm$ 0,08	117,46 $\pm$ 4,36	142,80 $\pm$ 1,48
Semente_3	109,53 $\pm$ 1,69	136,46 $\pm$ 5,77	108,32 $\pm$ 1,60	120,80 $\pm$ 3,45
Controle com $\text{AgNO}_3$ livre a 8 $\mu\text{M}$ = 123,50 $\pm$ 3,23				
Controle com $\text{AgNO}_3$ livre a 4 $\mu\text{M}$ = 110,59 $\pm$ 2,81				

O teste de viabilidade celular por MTT também foi realizado com fibroblastos da linhagem NIH 3T3 para análise de possível toxicidade das AgNPs nas amostras selecionadas

à 4 µM. Conforme mostra a Tabela 9, tanto as células tratadas com as amostras contendo AgNPs quanto seus respectivos controles apresentaram viabilidade celular acima de 70%. Além disso, algumas amostra contendo AgNPs apresentaram maior toxicidade quando comparado ao controle com AgNO<sub>3</sub> livre.

**Tabela 9:** Percentual de viabilidade celular *in vitro* de fibroblastos por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs e seus respectivos controles (Ctrl) a 4 µM. Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média.

	Ctrl extrato(%)	AgNPs (%)
Casca_25	95,37 ± 4,19	84,53 ± 5,57
Casca_6	89,21 ± 1,48	73,92 ± 1,44
Polpa_12	88,54 ± 0,27	72,73 ± 0,68
Semente_6	83,91 ± 4,58	86,90 ± 4,29
Semente_3	73,11 ± 0,17	74,78 ± 0,30
Controle com AgNO <sub>3</sub> livre = 96,86 ± 0,74 %		

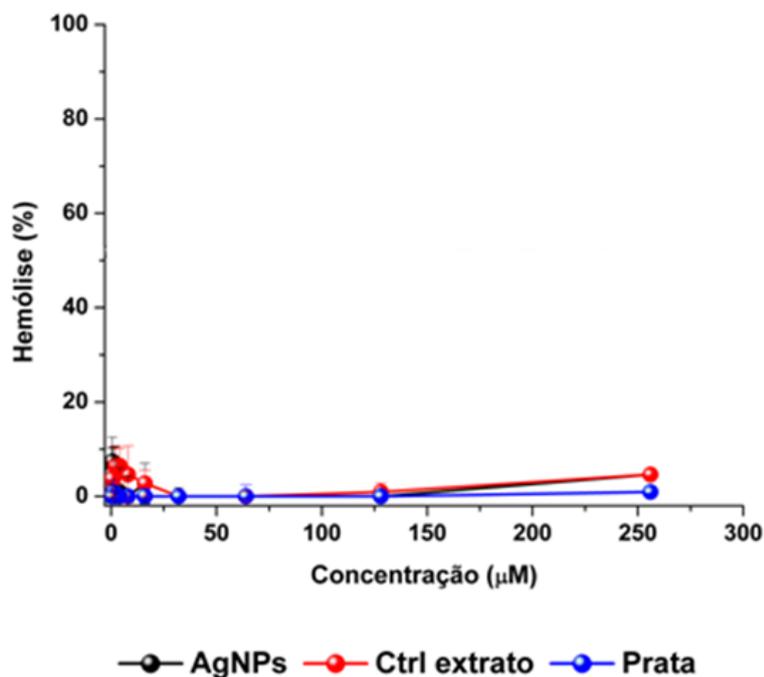
Aparentemente, os dados obtidos apresentaram pequena diferença no percentual de células viáveis dos fibroblastos expostos às AgNPs e seus controles, em que os fibroblastos parecem apresentar viabilidade menor na presença de AgNPs produzidas por extratos de sementes do que em seus respectivos controles (Tabela 9). Entretanto, tal evento pode ser justificado pelo mesmo fato ocorrido com as células de *C. krusei* em relação às amostras contendo AgNPs. O nitrato, presente nas amostras de AgNPs como possível contraíon, pode ter sido fonte de composto nitrogenado, como óxido nítrico (NO), importante para o desenvolvimento dos fibroblastos. O NO é uma molécula que atua como mensageiro intra- e intercelular em muitos processos fisiológicos (DIAZ, 1998).

Por outro lado, pode ter ocorrido sedimentação de partículas e, portanto, interferência no resultado, visto que a leitura da microplaca é realizada em comprimento de onda de 630 nm. Em estudo com AgNPs testadas em meio com *C. albicans*, foi observado precipitação de partículas na parte inferior dos tubos de ensaio, enquanto não houve a sedimentação em água

destilada (VAZQUEZ-MUÑOZ, 2014). No mesmo estudo, foi reportada a ação das AgNPs; que acontece com a aglomeração e acúmulo das mesmas fora das células fúngicas e posterior liberação de íons prata. A pesquisa sugere que a indução de morte celular ocorre com a interação de componentes celulares com a prata iônica.

Testes de atividade biológica também foram realizados com AgNPs obtidas por síntese verde com o extrato das folhas de *H. speciosa* coletados no verão, referente à amostra AgNPs\_6. Como já mencionado anteriormente, os ensaios biológicos das AgNPs\_6 incluem teste hemolítico e atividade nos seguintes sistemas: levedura *C. krusei*, bactéria *E. coli*, nematoides *C. elegans* e *M. incognita* e larvas de *A. aegypti*. As amostras de AgNPs imobilizadas em superfície interna de microtubos de polipropileno e de preformas de poli(tereftalato de etileno) foram testadas apenas contra *M. incognita* e *A. aegypti*, respectivamente.

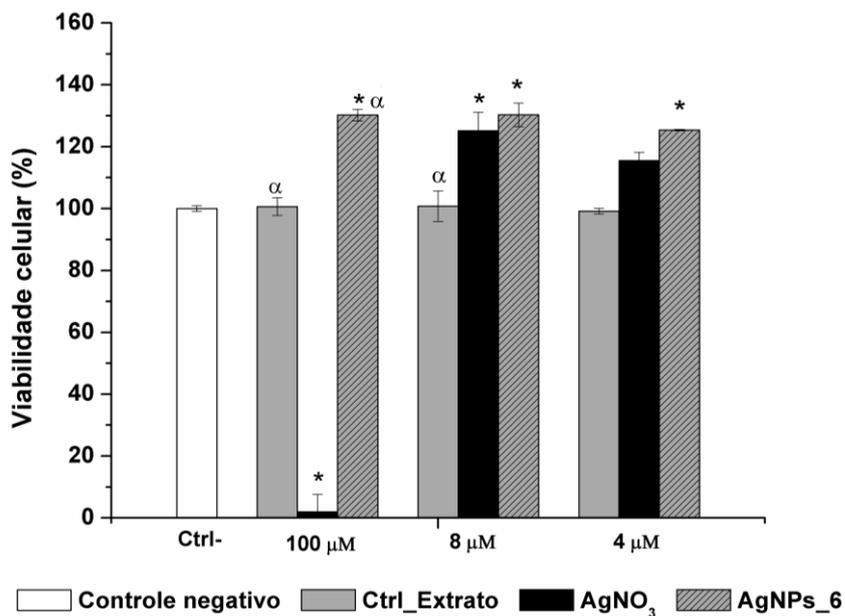
Para o teste de hemólise, as amostras de Folha\_AgNPs\_6 foram adicionadas às hemácias em concentrações seriadas de 256 a 0,25  $\mu\text{M}$ , como é demonstrado na Figura 24. As concentrações de AgNPs\_6 testadas e seus respectivos controles com extrato ou com  $\text{AgNO}_3$  apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo (com água) e semelhança com o controle negativo (0% de hemólise). Estudos de Krajewski (2013), mostraram nos ensaios de compatibilidade hemolítica que não houve alterações nos grupos tratados com concentrações AgNPs de 1 ou 3 mg/L. Apenas a concentração de 30 mg/L de AgNPs induziu hemólise. Confirmando os resultados obtidos no presente teste.



**Figura 24:** Teste hemolítico em várias concentrações de AgNPs\_6 obtidas por síntese verde com folhas de *H. speciosa*. No controle positivo tem presença de água e o controle negativo, solução fisiológica a 0,9%. Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Na Figura 25, as amostras de Folha\_AgNPs\_6 nas três concentrações testadas apresentaram maior viabilidade celular que o controle negativo, assim como a prata livre nas menores concentrações e as amostras em todas as concentrações, conforme ocorreu em amostras de AgNPs obtidas com extratos do fruto. No entanto, a Figura 25 mostra que a prata livre a 100  $\mu\text{M}$  foi capaz de diminuir a viabilidade celular das leveduras *C. krusei* em quase 100%. Segundo Vazquez-Muños (2014), a indução de morte celular por AgNPs ocorre com a interação de componentes celulares com íons prata ( $\text{Ag}^+$ ), o que pode justificar o resultado obtido com a maior concentração do íon. Contudo, as amostras com as AgNPs apresentaram maior viabilidade que o controle negativo, o mesmo ocorrido com as AgNPs sintetizadas com o fruto. Assim, conforme discutido anteriormente, há duas possibilidades: ou a prata e as AgNPs estimulam a viabilidade das leveduras, ou há interferência do AgNPs e/ou da prata no

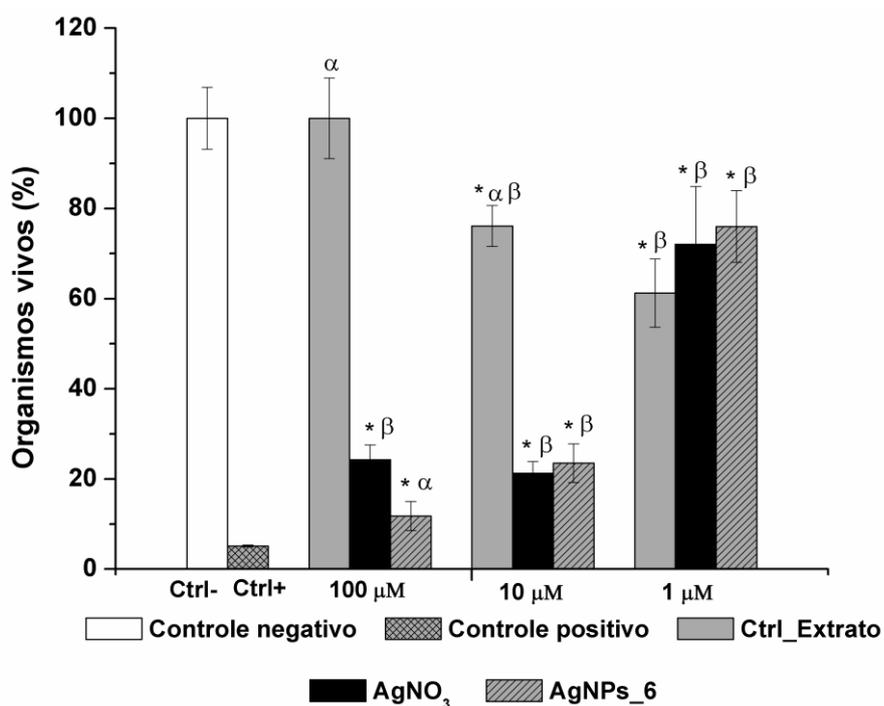
ensaio quando em contato com o meio de cultura (VAZQUEZ-MUÑOZ, 2014; HACSKAYLO, 1954).



**Figura 25:** Percentual de viabilidade celular de *C. krusei* por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs\_6 obtida por síntese com extrato de folhas de *H. speciosa*. Onde: \* indica diferença estatística significativa em relação ao controle negativo e  $\alpha$  indica diferença estatística significativa com relação ao controle com prata livre de mesma concentração equivalente ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Os resultados do ensaio de atividade biológica com o nematoide *C. elegans* demonstrados na Figura 26 indicam que apenas o controle referente ao extrato a 100  $\mu$ M foi semelhante ao controle negativo. A amostra Folha\_AgNPs\_6, nas concentrações menores (10 e 1  $\mu$ M), apresentou redução na viabilidade celular apesar de terem diferença em relação ao controle positivo. Dessa forma, a concentração de Folha\_AgNPs\_6 a 10  $\mu$ M e a 1  $\mu$ M apresentou diminuição de viabilidade em cerca de 75% e 20%, respectivamente, indicando influência da concentração de AgNPs na percentagem de nematoides vivos. É importante ressaltar que a prata livre também diminuiu consideravelmente a viabilidade conforme sua concentração, enfatizando os resultados obtidos nos estudos de Vazquez-Muños (2014) mencionados anteriormente. Ahn (2014), no estudo de toxicidade com três tipos de AgNPs

(sem revestimento e resvestidas por PVP com 8 e 38 nm) apresentaram efeitos dessas amostras em *C. elegans*. O estudo mostra que o revestimento e o tamanho das partículas influenciam na toxicidade (quanto menor a particular, mais tóxica) e que o estresse oxidativo mitocondrial e o dano ao DNA parecem ser mecanismos potenciais de toxicidade. Tais eventos podem ter ocorrido no presente ensaio com as AgNPs\_6 obtidas com extrato das folhas. Todavia, o provável revestimento de moléculas do extrato não interferiram na toxicidade das AgNPs\_6. Isso porque nas amostras em que houve maior viabilidade (concentrações 10 e 1  $\mu\text{M}$ ) não houve diferença significativa com a prata livre na mesma concentração.



**Figura 26:** Percentual de indivíduos vivos de *C. elegans* por ensaio de MTT na presença de amostras de AgNPs\_6 obtidas por síntese com extrato de folhas de *H. speciosa*. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo,  $\alpha$  indica diferença em relação ao controle com a prata livre de mesma concentração e  $\beta$  indica diferença em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

O teste de atividade bacteriana com *E. coli* foi realizado por microdiluição, no qual a quantificação de UFC/mL foi realizada por ponto. Essa metodologia foi realizada com

bactérias devido a suspeita de possíveis interferências ocorridas nos ensaios de viabilidade celular por meio de MTT, em que os resultados foram gerados por técnica de espectrometria de absorvância, como os realizados com *C. krusei* neste trabalho. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos pela técnica de microdiluição. Nela pode-se observar que aproximadamente 50% e 15% das UFC foram susceptíveis as AgNPs\_6 nas concentrações de 20 µM e 10 µM, respectivamente. Assim, as AgNPs\_6 diminuíram significativamente a formação de UFC/mL. Contudo, os controles referentes a AgNO<sub>3</sub> apresentaram maior efeito que as nanopartículas nas respectivas concentrações. Vários estudos com AgNPs mostram o efeito antimicrobiano das AgNPs. O estudo de Kaviya (2011), por exemplo, demonstra a ação antimicrobiana de AgNPs esféricas entre 10 a 35 nm (obtidas por síntese verde) contra *E. coli* e outras bactérias.

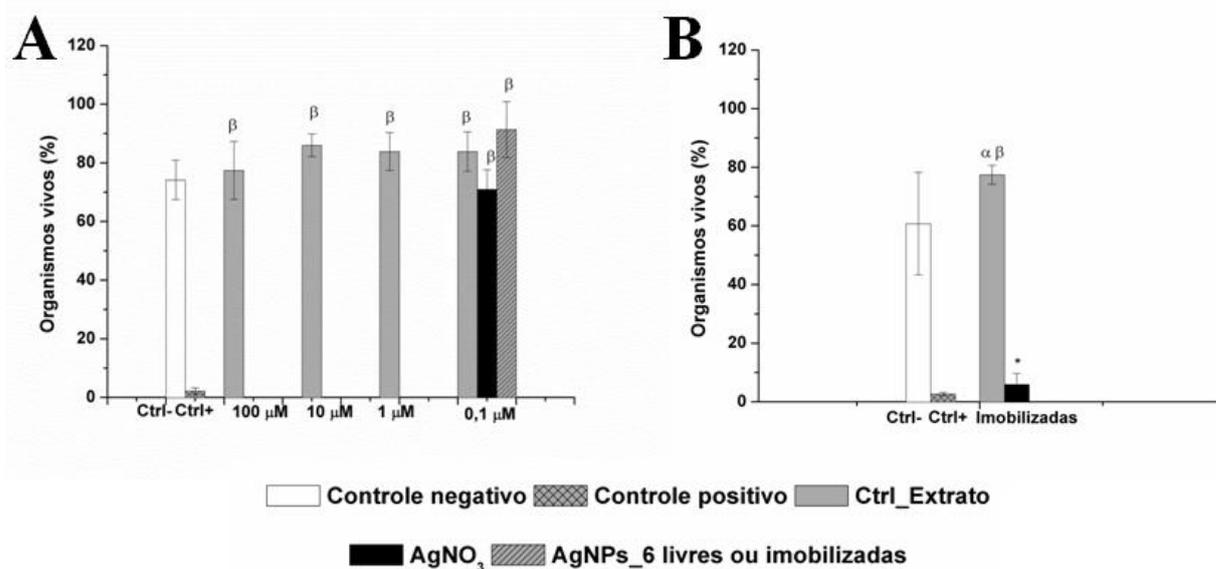
**Tabela 10:** Percentagem da média de UFC/mL da linhagem de *E. coli* DH5α após incubação (a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 6 horas) contendo amostras de AgNPs e seus respectivos controles (p < 0,05). Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média

Tratamento	Percentagem (%) de UFC/mL (10 <sup>6</sup> )
Controle negativo	100,00 ± 0,55
Controle positivo	0,00 ± 0,00
Controle Extrato a 20 µM	106,29 ± 0,58
Controle Prata a 20 µM	27,62 ± 0,40
Nanopartícula a 20 µM	49,61 ± 0,33
Controle Extrato a 10 µM	105,07 ± 0,69
Controle Prata a 10 µM	59,21 ± 0,51
Nanopartícula a 10 µM	84,30 ± 0,44

O teste de atividade biológica de AgNPs\_6 livres em fitonematoide *M. incognita* mostrou que apenas uma concentração mínima de AgNPs (0,1 µM) não foi suficiente para diminuir o número de nematoides vivos. Em todas as outras concentrações testadas (100, 10 e 1 µM), tanto de prata livre quanto de AgNPs, foram capazes de matar 100% dos nematoides

expostos por 48 horas às amostras (Figura 27A). Vale ressaltar que os controles referentes aos extratos nas respectivas concentrações apresentaram semelhança com o controle negativo.

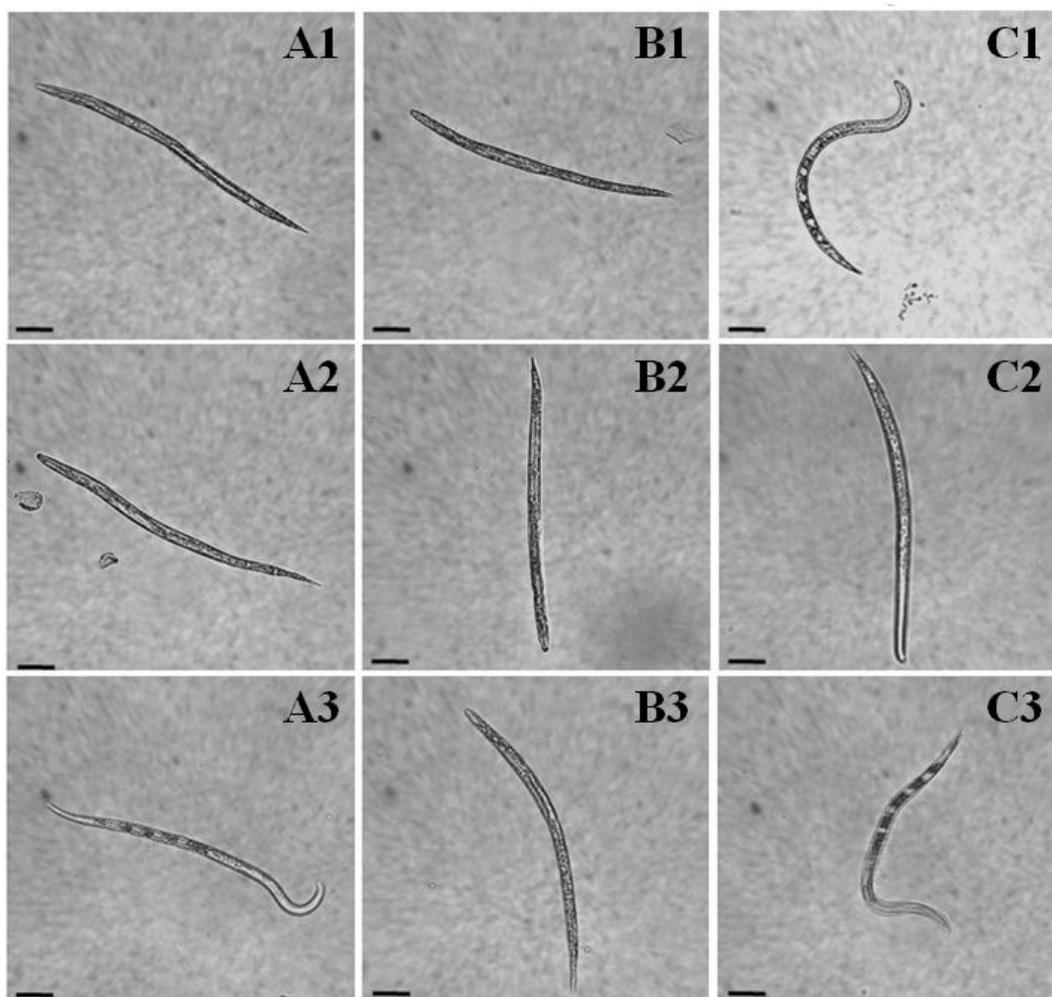
As AgNPs\_6 imobilizadas nos microtubos de polipropileno também diminuíram o número de nematoides em 100% e a prata iônica aproximou-se desse percentual, apresentando semelhança em relação ao controle positivo (Figura 27B). O possível mecanismo de toxicidade das AgNPs, já discutido, também pode ter ocorrido com *M. incognita*, que são: estresse oxidativo mitocondrial e dano ao DNA (AHN, 2014).



**Figura 27:** Percentual de indivíduos de *M. incognita* vivos após 48 horas na presença de amostras de Folha\_AgNPs\_6 (obtidas por síntese com extrato das folhas de *H. speciosa*) livres (A) e imobilizadas (B) em microtubos de polipropileno. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo, α indica diferença em relação ao controle com prata livre de mesma concentração e β indica diferença em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

A Figura 28 mostra aspectos morfológicos dos nematoides tratados com as AgNPs livres. As amostras referentes ao tratamento com AgNPs e AgNO<sub>3</sub> a 100 µM e a 1 µM apresentam nematoides esticados e paralizados, sem o formato serpentiforme característica

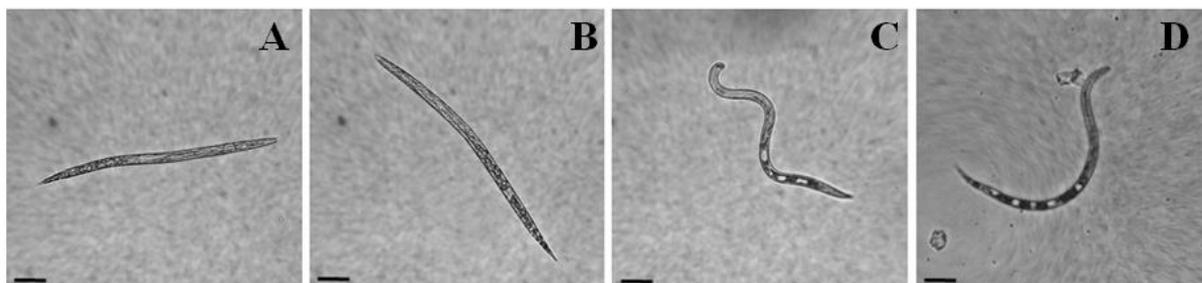
desses organismos, observados nos controles contendo somente o extrato e em todas as amostras na menor concentração (0,1  $\mu\text{M}$ ). Nos nematoides tratados com a prata livre, pode-se observar uma pigmentação escura, principalmente na amostra mais concentrada (Figura 28B1).



**Figura 28:** Imagens de microscopia de luz de fitonematoides *M. incognita* após tratamento durante 48 horas com AgNPs\_6 livres. A refere-se à amostra com AgNPs, B refere-se ao controle com  $\text{AgNO}_3$  e C refere-se ao controle com extrato. Onde: 1, 2 e 3 correspondem às concentrações 100  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 0,1  $\mu\text{M}$ . As barras nas imagens representam 50  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 29, também são observados aspectos morfológicos dos nematoides, porém tratados com AgNPs imobilizadas em microtubos de polipropileno. A análise microscópica

também apresenta nematoides esticados e paralizados com as amostras referentes às AgNPs e ao controle com AgNO<sub>3</sub>, o que não é observado nos demais controles (com extrato e com água). Pode-se observar também, nas imagens referentes ao tratamento com AgNO<sub>3</sub> que não houve pigmentação escura conforme observado anteriormente.

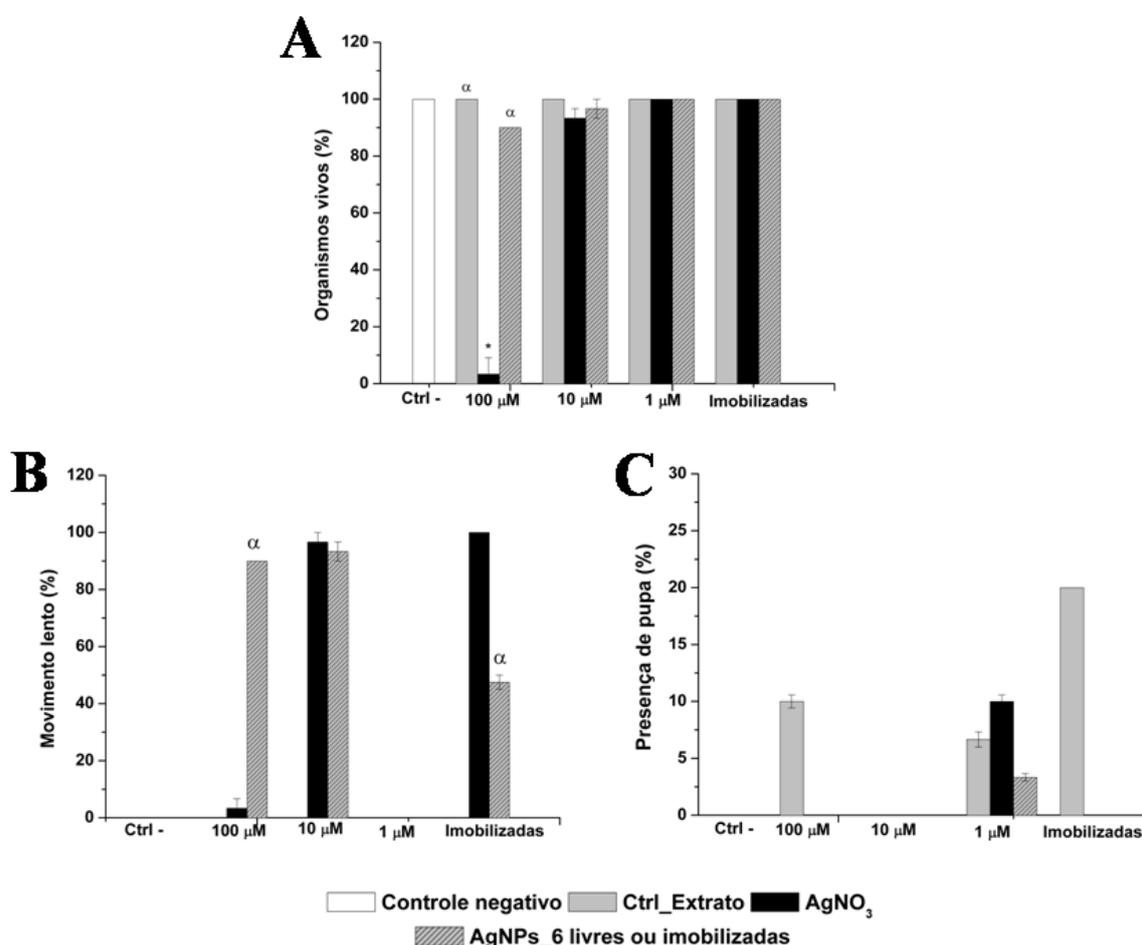


**Figura 29:** Imagens obtidas por microscopia de luz de fitonematoides *M. incognita* após tratamento durante 48 horas com AgNPs\_6 imobilizadas em microtubos de polipropileno. A refere-se aos microtubos com AgNPs, B refere-se aos microtubos com AgNO<sub>3</sub>, C refere-se aos microtubos com extrato e D refere-se ao controle negativo (água). As barras nas imagens representam 50  $\mu$ m.

Embora os mecanismos envolvendo a toxicidade de AgNPs não estejam elucidados, eventos como agregação, dissolução extra-organismo da prata e sua absorção pelo organismo, foram observados em estudo com *C. elegans*. Além disso, na mesma pesquisa, observou-se que as AgNPs testadas foram internalizadas e, pelo menos parte da toxicidade apresentada, foi ocasionada pela prata iônica. Foram apresentados ainda, métodos de análises que indicaram inibição de crescimento pelas AgNPs testadas (MEYER, 2010).

O teste de atividade biológica de AgNPs\_6 livres em larvas de *A. Aegypti* de quarto estágio mostrou que a prata livre a 100  $\mu$ M foi capaz de matar mais de 95% das larvas. Ao passo que nenhuma concentração de AgNPs apresentou letalidade contra esses organismos durante as 48 horas de exposição (Figura 30A). Contudo, aproximadamente 100% das larvas sobreviventes apresentaram alterações expressivas em sua motilidade nas amostras com as

concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . Pode-se observar também que nas preformas de PET onde haviam AgNPs imobilizadas quase 50% da população exposta à amostra apresentaram movimentos lentos. Nos controles referentes à  $\text{AgNO}_3$ , praticamente todas as larvas sobreviventes apresentaram redução da motilidade (Figura 30B). Vale ressaltar que as amostras de AgNPs e  $\text{AgNO}_3$  de menor concentração (1  $\mu\text{M}$ ) apresentaram desenvolvimento da larva em pupa, mostrando semelhança com os controles com extrato que apresentaram o mesmo evento (Figura 30C).



**Figura 30:** Percentual de larvas de mosquito *A. aegypti* na presença de amostras de Folha\_AgNPs\_6 (obtidas por síntese com extratos aquosos das folhas de *H. speciosa*) livres e imobilizadas em preformas PET. Os gráficos com a percentagem de organismos vivos (A), de alteração dos movimentos dos nematoides sobreviventes (B) e de presença de pupa (C) estão relacionados com as amostras testadas e seus respectivos controles. Onde: \* indica diferença em relação ao controle negativo,  $\alpha$  indica diferença em relação ao controle com a prata livre de mesma concentração ( $p < 0,05$ ). Os valores estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Diferentemente dos resultados apresentados, o estudo de Soni e Prakash (2012) mostrou AgNPs obtidas por síntese verde com o fungo *Chrysosporium tropicum* que tiveram eficácia contra larvas de *A. aegypti*. Nesse estudo, as AgNPs foram avaliadas nos quatro estágios larvais, sendo que a larva de segundo estágio apresentou 100% de mortalidade após 1 hora de exposição às partículas. Em estudo mais recente, AgNPs sintetizadas com extratos de folhas de *Leucas aspera* mostraram alto potencial larvicida quando em contato com larvas de quarto estágio de *A. aegypti* por 24 horas (SUGANYA, 2014).

## Sumarização dos resultados

Os resultados referentes às sínteses das AgNPs utilizando frutos e folhas, assim como a caracterização das AgNPs obtidas estão resumidos na Tabela 11. As amostras referem-se às suspensões de AgNPs correspondentes as concentrações de extrato (frutos maduros e folhas colhidos no verão) utilizadas na síntese de AgNPs selecionadas para os ensaios de atividade biológica. Vale ressaltar que os valores da tabela são aproximados.

**Tabela 11:** Sumarização dos resultados obtidos referentes às sínteses e caracterizações das suspensões de AgNPs obtidas por síntese verde com frutos (casca, polpa e semente) e folhas de *Hancornia speciosa*.

Amostras de AgNPs		Síntese/formação (espectrofotometria)	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Cond. Elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
Fruto maduro (verão)	Casca	AgNPs_25	FE	386,23	0,422	-18,9	85,87
		AgNPs_6	FE	174,80	0,357	-23,4	53,10
	Polpa	AgNPs_12	FE	537,77	0,586	-16,1	74,83
		AgNPs_6	FE	334,47	0,621	-18,5	53,63
	Semente	AgNPs_6	FE	332,12	0,442	-20,4	52,64
		AgNPs_3	FE	273,47	0,380	-22,9	38,40
Fruto maduro (inverno)	Casca	AgNPs_25	FE	345,63	0,387	-12,8	168,00
		AgNPs_6	FE	599,40	0,455	-17,1	77,50
	Polpa	AgNPs_12	FE	298,87	0,508	-26,9	62,43
		AgNPs_6	FE	411,60	0,564	-7,6	63,80
	Semente	AgNPs_6	AF	-	-	-	-
		AgNPs_3	AF	-	-	-	-
Fruto verde (inverno)	Casca	AgNPs_25	FE	288,00	0,551	-23,4	74,13
		AgNPs_6	AF	-	-	-	-
	Polpa	AgNPs_12	AF	-	-	-	-
		AgNPs_6	AF	-	-	-	-
	Semente	AgNPs_6	AF	-	-	-	-
		AgNPs_3	AF	-	-	-	-
Folhas (verão)	25°C 24 hs	AgNPs_25	AF	-	-	-	-
		AgNPs_6	AF	-	-	-	-
		AgNPs_12	AF	-	-	-	-
		AgNPs_3	AF	-	-	-	-
	50°C 24 hs	AgNPs_3	FE	230,50	0,411	-27,4	21,03
	75°C/ 24 hs	AgNPs_25	FE	109,47	0,199	-23,4	65,07
		AgNPs_12	FE	78,79	0,264	-23,0	52,57
		AgNPs_6	FE	70,33	0,267	-20,7	44,83
		AgNPs_3	FE	63,14	0,322	-20,3	44,47
	75°C 12 hs	AgNPs_6	FE	81,77	0,274	-27,7	49,53

FE - Formação evidenciada/ AF - Ausência de formação

Os resultados referentes aos testes de atividade biológica realizados com as suspensões de AgNPs obtidas também foram resumidos e são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Sumarização dos resultados obtidos referentes aos testes de atividade biológica realizados com as suspensões de AgNPs obtidas por síntese verde com extratos dos frutos (casca, polpa e semente) e sementes de *Hancornia speciosa* Gomes.

Testes de atividade biológica	Frutos maduros do verão					Folhas do verão	
	Casca		Polpa	Semente		75°C/12 hs	
	AgNPs_25	AgNPs_6	AgNPs_12	AgNPs_6	AgNPs_3	AgNPs_6 livres	AgNPs_6 imob.
Susceptibilidade de <i>F. oxysporum</i>	4 µM	4 µM	4 µM	4 µM	4 µM	NR	NR
Susceptibilidade de <i>T. mentagrophytes</i>	16 µM	8 µM	16 µM	8 µM	8 µM	NR	NR
Viabilidade celular de <i>C. krusei</i>	> 100%	> 100%	> 100%	> 100%	> 100%	> 100%	NR
Viabilidade celular de fibroblasto NIH 3T3	84,53%	73,92%	72,73%	86,90%	74,78%	NR	NR
Hemólise	NR	NR	NR	NR	NR	~ 0%	NR
Formação de UFC/mL de <i>E. coli</i>	NR	NR	NR	NR	NR	25% 50%	NR
Mortalidade de <i>C. elegans</i>	NR	NR	NR	NR	NR	20%, 75%, 90%	NR
Mortalidade de - <i>M. incognita</i>	NR	NR	NR	NR	NR	100%	100%
Mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i>	NR	NR	NR	NR	NR	~ 100%	100%
Movimento lento de larvas de <i>A. aegypti</i>	NR	NR	NR	NR	NR	~ 90%	~ 50%

NR - não realizado

## Conclusões

O presente trabalho, apresentou AgNPs provenientes de rotas de síntese realizadas com diferentes extratos aquosos de *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba ou mangabeira). Essas sínteses mostraram que as AgNPs foram obtidas pela redução da  $Ag^+$  por meio da mistura reacional desses extratos com solução de  $AgNO_3$  a 1 mM (concentração final). Por se tratar de extratos da planta, metabólitos primários e secundários, que podem ser variáveis, atuaram na biorredução da prata iônica à prata metálica. Assim, os frutos destinados às rotas de síntese tiveram origens sazonais distintas (verão = período de chuvas e inverno = período de seca), bem como estágio de maturação (maduro e verde). De cada fruto obteve-se o extrato da casca, da polpa e da semente. A formação de AgNPs teve maior evidência nas sínteses realizadas com a casca e a polpa do fruto coletados no inverno.

As AgNPs de maior estabilidade coloidal obtidas dessas sínteses foram Casca\_AgNPs\_3 e Polpa\_AgNPs\_12, com potencial Zeta de superfície de aproximadamente -21 e -27 mV respectivamente. As sínteses realizadas com o extrato da semente do fruto maduro e o extrato da polpa do fruto verde, ambos coletados no inverno, não apresentaram formação evidente de partículas pela técnica de espectroscopia de absorvância na região do visível. De modo geral, o diâmetro hidrodinâmico das partículas teve grande variação, tendo menor valor; o diâmetro das partículas oriundas de concentrações baixas de extrato. Os valores do índice de polidispersividade (PdI) também tiveram grande variação, tendo entre 0,3 e 0,9 para o menor e maior valor, respectivamente, sugerindo estruturas próximo à monodispersão até estruturas altamente polidispersas.

As sínteses realizadas com as folhas tiveram as cinco concentrações de extrato testadas e não apresentaram evidência de AgNPs formadas à temperatura ambiente. Com isso, a otimização dessas sínteses foi realizada aumentando-se a temperatura para 50°C e, posteriormente para 75°C. Nas sínteses realizadas a 75°C, o PdI e o diâmetro hidrodinâmico das partículas diminuíram de acordo com a diminuição da concentração de extrato e a carga

superficial das AgNPs apresentaram pequena variação. Dentre as concentrações testadas, a de 6,25 mg/mL de extrato foi selecionada para a síntese de AgNPs a 75°C por 12 horas. As AgNPs dessa apresentaram PDI de 0,274, potencial Zeta de superfície de -27,7 e diâmetro hidrodinâmico de 81,77 nm de acordo com o *Z-average*, aproximadamente. Vale ressaltar que o diâmetro hidrodinâmico de acordo com o número de partículas da amostra foi de aproximadamente 30 nm.

Todas as amostras de AgNPs apresentaram o mesmo perfil de condutividade elétrica, que variou de acordo com a concentração de cada extrato independente da parte da planta. Quanto mais concentrado o extrato, maior a condutividade elétrica da amostra de AgNPs, que por sua vez, é maior que a condutividade elétrica do respectivo extrato.

O teste de estabilidade realizado com a amostra Folha\_AgNPs\_6 mostrou a permanência do valor de potencial Zeta de superfície durante aproximadamente 30 dias chegando ao valor aproximado de -23 mV após os três meses de monitoramento. Contudo, não houve variação do diâmetro hidrodinâmico e estas partículas apresentaram alteração mínima para os parâmetros de PDI e condutividade elétrica após 30 dias.

As AgNPs\_6 obtidas da síntese com folhas foram imobilizadas na superfície interna de preformas de poli(tereftalato de etileno) - PET e em superfície interna de microtubos de polipropileno por adsorção. A seleção da área para avaliar as possíveis alterações de nanorrugosidade foi selecionada por parâmetros de Ra, Rq, Rz e Rzjis, que foram maiores para a área 3 (fundo da preforma no caso dos PET). Apesar da ausência de diferenças quantitativas de nanorrugosidade entre as superfícies tratadas (AgNO<sub>3</sub> e AgNPs), as imagens topográficas de microscopia de força atômica (MFA) apresentaram distinção entre as superfícies por essas imagens. Além disso, tanto a superfície com AgNPs\_6 imobilizadas quanto as tratadas com AgNO<sub>3</sub> apresentaram diferença comparada as superfícies sem tratamento. Este, por sua vez, apresentou forças atrativas de maior intensidade. As características de adevidade e elasticidade não são alteradas após tratamento com AgNPs.

As amostras de AgNPs obtidas do fruto maduro da estação verão selecionadas (Casca\_AgNPs\_25, Casca\_AgNPs\_6, Polpa\_AgNPs\_12, Semente\_AgNPs\_6 e Semente\_AgNPs\_\_3) para os testes de atividade biológica apresentaram AgNPs com variação de altura entre 8 nm e 27 nm, medidas por MFA. A amostra selecionada do extrato aquoso das folhas (Folha\_AgNPs\_6) apresentou duas subpopulações de partículas de 9 e 18 nm.

As amostras do fruto e seus controles contendo AgNO<sub>3</sub> inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxisporum* em concentração de 4 µM. Já o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* apresentou inibição de crescimento nas concentrações de 8 e 16 µM. Os fibroblastos apresentaram viabilidade celular em torno de 70% com as AgNPs. A levedura *Candida krusei* apresentou viabilidade celular inalterada ou até mesmo aumentada para as amostras obtidas dos extratos aquosos dos frutos das folhas. Apenas AgNO<sub>3</sub> a 100 µM diminuiu viabilidade celular desses microrganismos.

As AgNPs provenientes do extrato aquoso das folhas não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas. Contudo, a sobrevivência dos nematoides *C. elegans* diminuiu cerca de 75% e 20% nas concentrações de 10 µM e 1 µM, respectivamente. As mesmas AgNPs diminuíram a formação de UFC/mL de *E. coli* em 50% na concentração de 20 µM. Além disso, AgNPs livres a 1 µM foram suficientes para matar 100% dos nematoides, assim como a prata livre. As AgNPs\_imobilizadas nos microtubos de polipropileno tiveram o mesmo perfil, porém a prata livre diminuiu menos o número de organismos vivos.

O teste de atividade biológica de AgNPs\_6 livres contra larvas de *A. Aegypti* de quarto estágio mostrou que a prata livre a 100 µM foi capaz de matar mais de 95% das larvas. Aproximadamente 100% das larvas sobreviventes apresentaram alteração em sua motilidade nas amostras com as concentrações de 100 µM e 10 µM de AgNPs\_6 livres. Nas AgNPs imobilizadas em preformas de PET, quase 50% da população de larvas expostas à amostra apresentaram movimentos lentos. Praticamente todas as larvas sobreviventes apresentaram diminuição da motilidade.

## Produção científica

### Capítulo de Livro:

**Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas.** Autores: Luciano Paulino Silva, Cíntia Caetano Bonatto, Flávio Duque Estrada Soares Pereira, Luciane Dias Silva, Vanessa Lima Albernaz, Vera Lúcia Perussi Polez. Livro: Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria - Fundamentos e Aplicações.

### Resumos:

SILVA, L. D., BARBOSA, E. F. e SILVA, L. P. **Topographic and mechanics characterization of Poly (Ethylene terephthalate) – PET performs intern surface displaying clear and pigmentation.** (Publicado em anais do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2013).

SILVA, L. D., AGUSTINI, B. C. e SILVA, L. P. **Síntese verde de nanopartículas de prata e ferro utilizando a levedura *Candida krusei* e seus efeitos nesta mesma levedura em cultura.** (Publicado em anais do XVIII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013).

SILVA, L. D., BARBOSA, E. F. e SILVA, L. P. **Caracterização topográfica da superfície interna de preformas de poli (tereftalato de etileno) – PET incolores e pigmentadas.** (Publicado em anais do XVII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2012).

## Referências bibliográficas

AHN, J.M. et al. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**. v. 108, 2014. p. 343-352.

AKHTAR, B. S. et al. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS sustainable Chemistry and Engineering**. v. 1, 2013. p. 591-602.

ALSHEHRI, A. H. et al. Enhanced electrical conductivity of silver nanoparticles for high frequency electronic applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**. v. 4, n. 12, 2012. p. 7007 – 7010.

ARMENDARIZ, V. et al. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. **Journal of Nanoparticle Research**. v. 6, n. 4, 2004. p. 377-382.

ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACS Nano**. v. 3, n.2, 2009. p . 279 – 290.

BAKER, S. et al. Plants: Emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. **Bioimpacts**. v. 3, n. 3, 2013. p. 111-117.

BALACHANDRAN, Y. L. et al. Differently Environment Stable Bio-Silver Nanoparticles: Study on Their Optical Enhancing and Antibacterial Properties. **PLoS ONE**. v. 8, n. 10, 2013.

BARBOSA, E. F. e SILVA, L. P. Nanoscale analyses of modified polypropylene microtubes internal surface: na approach covering topographical and force spectroscopic parameters. **Surface and Interface Analysis**. v. 45, n. 11-12, 2013. p. 1721-1726.

BARROS, I. M. C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2008. 194 f. Dissertação (Ciências da Saúde) – Programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

CHANDRAN, S. P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. **Biotechnology Progress**. v. 22, n. 2, 2006. p. 577-583.

CHEN, H. et al. Synthesis of Palladium Nanoparticles and Their Applications for Surface-Enhanced Raman Scattering and Electrocatalysis. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 114, n. 50, 2010. p. 21976-21981.

DIAZ, J. D. et al. Reference interval for human plasma nitric oxide end products. **Clinical Biochemistry**. v. 31, n. 6, 1998. p. 513-515.

ENDRINGER, D. C. **Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e feito na quimioprevenção de câncer**. 260f. Tese (Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GADDAM, S. A. et al. Efficient and robust biofabrication of nanoparticles by cassia alata leaf extract and their antimicrobial activity. **J. Nanostruct.** v. 4, n. 82, 2014. p. 1-9.

GOMES, W. F et al. **Estudos químicos de recursos naturais renováveis do estado de Sergipe: *Hancornia speciosa* Gomes**. 2010. 171 f. Dissertação (Química) – Núcleo de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GOPINATH, V. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A noble biological approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 96, n. 1, 2012. p. 69-74.

HACSKAYLO, J. et al. Growth of fungi on three sources of nitrogen. **Mycological society of America**. v. 46, n. 6, 1954. p. 691 – 701.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**. v. 18, n. 10, 2007. 11p.

HUH, A. J. e KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **J Control Release**. v. 156, n. 2, 2011. p. 128 – 145.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**. v. 13, n. 10, 2011. p. 2638-2650.

KAVIYA, S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 79, n. 3, 2011. p. 594-598

KHAN, M. J. et al. Polyaniline-assisted silver nanoparticles: a novel support for the immobilization of  $\alpha$ -amilase. **Biotechnological products and process engineering**. v. 97, 2013. p. 1513-1522.

KIM, S. W. et al. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**. v. 40, n. 1, 2012. p. 53-58.

KRAJEWSKI, S. et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. **Acta Biomaterialia**. v. 9, n. 7, 2013. p. 7460–7468.

KUBOTA, T. **Contribuição à química dos compostos voláteis dos frutos do nordeste: *Hancornia speciosa* Gomes**. 2007. 122 f. Dissertação (Química) – Núcleo de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão.

KUMAR, P.P. N. V. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. **Industrial Crops and Products**. v. 1, n. 52, 2014. p. 562-566.

KUMAR, V. e YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**. v. 84, n. 2, 2008. p. 151-157.

KUMAR, V. e YADAV, S. K. Synthesis of different-sized silver nanoparticles by simply varying reaction conditions with leaf extracts of *Bauhinia variegata* L. **IET Nanobiotechnol.** v. 6, n. 1, 2012. p. 1 – 8.

LI, Z. et al. A simple method for selective immobilization of silver nanoparticles. **Applied Surface Science.** v. 250, n. 1-4, 2005. p. 109-116.

LIU, X et al. Facile fabrication of an interface for online coupling of microchip CE to surface plasmon. **Bioanalysis.** v. 4, n. 4, 2012. p. 373–379.

MEYER, J. N. et al. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Aquatic toxicology.** v. 100, n. 2, 2010. p. 140-150.

MITTAL, A. K. et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances.** v. 31, n. 2, 2013. p. 346-356.

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. **The Journal Physical Chemistry C.** v. 111, n. 10, 2007. p. 3806-3819.

PUVANAKRISHNAN, P. et al. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: effect of particle type and dosing strategy. **Int J Nanomedicine.** v. 7, 2012. p. 1251-1258.

RASTEGARZADEH, S. e HASHEMI, F. A surface plasmon resonance sensing method for determining captopril based on in situ formation of silver nanoparticles using ascorbic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 122, n. 25, 2014. p. 536-541.

RUSSELL, J. B. **Química Geral.** Volume 1. Ed. Makron Books. 2ª edição. 1994.

SAMPAIO, T. S. S. **Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** 2008. 148f. Dissertação (Química) – Núcleo de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

SAMPAIO, T. S. S. e NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 95, n. 4, 2006. p. 606 - 610.

SHANKAR, S. S. et al. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **Journal of Materials Chemistry**. v. 13, n. 1, 2003. p. 1822-1826.

SHANKAR, S. S. et al. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 275, n. 2, 2004. p. 496-502.

SUGANYA, G. et al. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from *Leucas aspera* leaf extracts against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitol Res**. v. 113, n. 5, 2014. p. 1673 – 1679.

THAKKAR, K. N. et al. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 6, n. 2, 2010. p. 257-262.

VAZQUEZ-MUÑOZ, R. et al. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. **PLoS ONE**. v. 9, n. 10, 2014.

YANG, M. et al. Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors. **Biosensors and Bioelectronic**. v. 21, n. 7, 2006. p. 1125-1131.